

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



**PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DA DENSIDADE VASCULAR  
DOS TUMORES TESTICULARES EM CÃES.**

CLAUDIA CRISTINA DOS SANTOS ROQUE ALVARADO

ORIENTADOR

Doutora Luísa Maria Freire Leal  
Mateus

COORDINADOR

Doutor Alexandre José Neto Trindade

TUTOR

Mestre Joaquín Vicente Cerdeira  
Lozano.

2020



UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



**PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DA DENSIDADE VASCULAR  
DOS TUMORES TESTICULARES EM CÃES.**

CLAUDIA CRISTINA DOS SANTOS ROQUE ALVARADO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI:

PRESIDENTE

Doutora Maria da Conceição da Cunha e  
Vasconcelos Peleteiro

VOGAIS:

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus  
Doutora Maria Luísa Mendes Jorge

ORIENTADOR

Doutora Luísa Maria Freire Leal  
Mateus

COORIENTADOR

Doutor Alexandre José Neto Trindade

TUTOR

Mestre Joaquín Vicente Cerdeira  
Lozano.

### 3 – DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome Claudia Cristina dos Santos Roque Alvarado

Título da Tese ou Dissertação:

PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DA DENSIDADE VASCULAR DOS TUMORES TESTICULARES EM CÃES.

Mestrado integrado em Medicina Veterinária.

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

☒ Clínica

☐ Produção Animal e Segurança Alimentar

☐ Morfologia e Função

☐ Sanidade Animal

Declaro sob compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

1. ☒ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
2. ☐ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três, retirando as que não interessam):

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
2. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
3. NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 19 de Novembro de 2020

(Indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: \_\_\_\_\_





## AGRADECIMENTOS

Gostava de agradecer em primeiro lugar à minha orientadora, Professora Doutora Luísa Mateus, por ser a pessoa que tem sido comigo, por tudo o que aprendi com ela que agora levo para sempre comigo.

Ao Doutor Alexandre Trindade, por toda a paciência que teve comigo e por ensinar-me tudo o que hoje sei do laboratório, muito obrigada.

A Joaquin Cerdeira, por haberme abierto las puertas y enseñarme lo lindo que es el campo de la Reproducción de pequeños animales. Así como al Profesor Luis Félix, quien me proporcionó excelentes oportunidades.

A toda a equipa do HEV, médicos, professores, enfermeiras e estagiários, por ajudar-me a aprender cada dia um pouco mais sobre a prática clínica e a convivência no ambiente hospitalar, obrigada.

Ao Dr. Rui Ferreira, por partilhar os seus conhecimentos e por participar ativamente neste trabalho, muito obrigada.

Ao Dr. Hugo Pissarra, por toda a disponibilidade oferecida durante estes meses de escrita.

Ao Prof. Luís Telo da Gama, pela ajuda na análise estatística.

Agradecer también a las personas más importantes em mi vida: Mario, Elsa y Andrea, por haber hecho de mi quien hoy soy.

Al amor en mi vida, mis abuelos Maria y Manuel, quienes me llenaron de amor durante este período. A toda mi familia, los Alvarado y los Dos Santos, por animarme siempre que es necesario.

A mis mejores amigos de la vida, quienes siempre me han acompañado, desde lejos o a mi lado: Amanda, Laura, Juliana, Fabianna, Marivi, Mariana, Marigabi y Carlos, por hacerme siempre más feliz, gracias totales.

Um agradecimento muito especial a família que me adotou durante estes anos de curso, Amanda e os seus pais, muito obrigada.

As minhas minivets, que têm sido a parte mais divertida de todo o percurso pela FMV: Alejandra, Marta, Nathalya, Catarina, Sara, Soraia e Anita, vocês fizeram-me sentir em casa, muito obrigada.

As minhas companheiras de casa: Jessi, Tati e Goretinha, por terem sido o meu sítio seguro, meu lar, por partilhar a casa e a vida comigo, obrigada.

To the human being that has been lately making me happy and supporting me every single time: Chris, I'm more than grateful to you and your family.

A *La casa que vence la sombra*, la Universidad Central de Venezuela, junto con todos los profesores que me acompañaron durante mi primer año, que me dieron las bases para sustentarme en otro lugar, pero sobre todo, a mis amigos de la UCV: Isa, Andrea, Pati, Furia, Loong, Maribel, Elis y Carlos, muchas gracias por darme el mejor último año en Venezuela. Ao Hospital Veterinário de Leiria, o Consultório Veterinário da Ajuda, por abrir-me as portas e ensinar-me o dia a dia do Médico Veterinário durante o curso, muito obrigada. A Pablito, por haberme proporcionado una experiencia laboral inolvidable en Colombia, junto con el equipo del Centro universitario de atención veterinaria de la Universidad Agraria de Colombia, a la Clínica Veterinaria de Bogotá y al equipo veterinário del Parque Jaime Duqué.

Por último, mas não menos importante, á todos os professores da Faculdade de Medicina Veterinária, que marcaram a minha vida de diferentes maneiras, muito obrigada por tudo o que aprendei.



## **RESUMO**

### **PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DA DENSIDADE VASCULAR DOS TUMORES TESTICULARES NOS CÃES**

Os tumores testiculares representam o segundo tipo de alterações oncológicas mais comuns em cães. Os três tipos de tumores testiculares diagnosticados com maior frequência são os leydigomas, seminomas e sertolinomas. Para estudar a prevalência dos tumores testiculares em cães, assim como o tipo de tumor que aparece mais frequentemente, foram recolhidas informações sobre os cães registados no HEV-FMV (n=31710) e dos cães com diagnóstico histopatológico de tumor testicular pelo Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária (n=246), durante o período de 7 anos. A prevalência de tumores testiculares foi de 0,8%, sendo que os leydigomas foram o tipo de neoplasia mais frequente, diagnosticados em 153 cães (62,3%) ( $p < 0,001$ ). A média da idade dos animais diagnosticados com tumor testicular foi de  $10,69 \pm 2,7$  anos e a raça que apresentou um risco estimado mais elevado de desenvolver tumores testiculares foi a Golden Retriever.

Com o objetivo de caracterizar o padrão vascular dos 3 tipos de tumores testiculares mais comuns, foi feita a avaliação dos testículos de 13 cães por ecografia antes da orquiectomia, e posteriormente por imunofluorescência (marcação com os anticorpos anti-CD31 e anti-SMA). Infelizmente, em termo ecográficos não foi possível demonstrar um padrão vascular discriminativo para os diferentes tipos de tumor. No entanto, o leydigoma demonstrou ser o tipo de tumor testicular com maior densidade vascular ( $p < 0,01$ ) quando comparado com tecido testicular normal ou atrofiado ou com o seminoma, através do método de imunofluorescência.

**Palavras chaves: Cão, Tumor testicular; Ecografia, Imunofluorescência**

## **ABSTRACT**

### **PREVALENCE AND VASCULAR DENSITY CHARACTERIZATION OF TESTICULAR TUMORS IN DOGS**

Testicular tumors represent the second type of most common neoplasia in dogs. The three types of testicular tumors most frequently diagnosed are leydigomas, seminomas and sertolinomas. To study the prevalence of testicular tumors in dogs, as well as the type of tumor that appears more frequently, we collected the information about dogs registered in the HEV-FMV (n=31710) and dogs with histopathological diagnosis of testicular tumor done by the Laboratory of Pathological Anatomy of the Faculty of Veterinary Medicine (n=246), during the period of 7 years. The prevalence of testicular tumors was 0.8%, and the leydigomas were the most frequent type of neoplasm, diagnosed in 153 dogs (62,3%) ( $p < 0,001$ ). The mean age of animals diagnosed with testicular tumor was  $10.69 \pm 2.7$  years and the breed that had a higher estimated risk of developing testicular tumor was Golden Retriever.

In order to characterize the vascular pattern of the 3 most common types of testicular tumors, testicles of 13 dogs were evaluated by ultrasound before orchiectomy and previously by immunofluorescence (marking made with antibodies anti-cd31 and anti-sma). Unfortunately, in ultrasonography terms, it was not possible to demonstrate a vascular pattern characteristic of the different tumors. However, leydigoma proved to be the type of testicular tumor with higher vascular density ( $p < 0.01$ ) when compared with normal or atrophy testicular tissue or with seminoma, using the immunofluorescence method.

**Keywords: Dog, Testicular tumor, Ultrasound, Immunofluorescence**

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>ii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vi</b>
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE GRÁFICOS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS .....	xi
<b>I.RELATÓRIO DE ESTÁGIO .....</b>	<b>1</b>
<b>II.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
1. Biologia tumoral .....	3
Angiogénese tumoral .....	5
Mecanismos da angiogénese .....	5
Reguladores da angiogénese tumoral .....	6
2. Tumores testiculares no cão: .....	7
Incidência: .....	7
Fatores de risco: .....	8
Caracterização macroscópica e classificação histológica dos tumores testiculares nos cães .....	9
Anamnese e Sinais Clínicos. ....	10
Diagnóstico: .....	11
Terapêutica e prognóstico: .....	12
Comparação com a Medicina Humana. ....	13
3. Ecografia testicular: .....	14
Avaliação testicular .....	14
Doppler-Cor .....	15
<b>III.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>IV.OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>

<b>V.PREVALÊNCIA DE TUMORES TESTICULARES EM CÃES OBSERVADOS NO HOSPITAL ESCOLAR DA FMV.</b>	<b>18</b>
---	-----------

MATERIAL E MÉTODOS.	18
---------------------	----

RESULTADOS.	19
-------------	----

DISCUSSÃO.	26
------------	----

<b>VI.AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE VASCULARIZAÇÃO TUMORAL POR DOPPLER E IMUNOFLUORESCÊNCIA.</b>	<b>30</b>
---	-----------

MATERIAL E MÉTODOS	30
--------------------	----

RESULTADOS.	33
-------------	----

DISCUSSÃO.	39
------------	----

<b>VII.CONCLUSÃO.</b>	<b>42</b>
-----------------------	-----------

<b>VIII.BIBLIOGRAFIA.</b>	<b>43</b>
---------------------------	-----------

<b>IX.ANEXOS.</b>	<b>47</b>
-------------------	-----------

Anexo 1 - Comissão de Ética para a Investigação e Ensino da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa	47
---	----

Anexo 2 – Raças de cães machos diagnosticados com tumor testicular e o tipo de tumores.	48
---	----

Anexo 3 - Valores da densidade vascular avaliada nas imagens ecográficas analisadas com a sonda linear, em dois testículos (n=2) com três medições (n=3) e diagnóstico de Leydigoma.	49
--	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Componentes celulares e moleculares do ecossistema tumoral que moldam a angiogénese no tumor. Adaptado de Zuazo-Gaztelu e Casanovas (2018). ....	4
Figura 2 – Mecanismos de formação de vasos, a. Angiogénese germinativa. b. Angiogénese intussusceptiva. c. Vasculogénese. d. Recrutamento de células progenitoras endoteliais. e. Mimetismo vascular. F. Trans-diferenciação das células estaminais do cancro - Adaptado de Lugano et al. (2020) .....	6
Figura 3 – Aspeto ecográfico do testículo normal, sinalando o mediastino testicular.....	13
Figura 4 – Prevalência dos diferentes tipos de tumores testiculares diagnosticados no Laboratório de Anatomia Patológica. ....	19
Figura 5 – Aspeto macroscópico e histológico de leydigoma (a), seminoma (b) e sertolinoma (c). ....	34
Figura 6 – Exemplo de marcação por imunofluorescência (RGB 20x; Vermelho: Anti-SMA, Verde: Anti-CD31, Azul: Núcleo da célula) e de padrão de vascularização avaliado por Doppler cor num caso de leydigoma .....	35
Figura 7 – Exemplo de marcação por imunofluorescência (RGB 20x; Vermelho: Anti-SMA, Verde: Anti-CD31, Azul: Núcleo da célula) e de padrão de vascularização avaliado por Doppler cor num caso de seminoma.....	36
Figura 8 - Exemplo de marcação por imunofluorescência (RGB 20x; Vermelho: Anti-SMA, Verde: Anti-CD31, Azul: Núcleo da célula) e de padrão de vascularização avaliado por Doppler cor num caso de sertolinoma .....	37
Figura 9 – Exemplos de sonogramas obtidos com sonda linear num caso de leydigoma (a) Power Doppler, (b) Doppler cor.....	38

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição da idade dos animais com tumores testiculares por classes	20
Gráfico 2 - Distribuição da idade dos animais com tumores testiculares do tipo leydigoma por classes.....	20
Gráfico 3 - Distribuição da idade dos animais com tumores testiculares do tipo seminoma por classes.....	21
Gráfico 4 - Distribuição da idade dos animais com tumores testiculares do tipo sertolinoma por classes.....	21
Gráfico 5 - Raças de cães mais frequentemente diagnosticadas com tumores testiculares e o tipo de tumor.....	27



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de animais com tumores testiculares e o tipo neoplasia.....	20
Tabela 2 – Distribuição das idades dos animais diagnosticados com tumores testiculares. ....	20
Tabela 3 – Prevalência de criptorquidismo.....	23
Tabela 4 – Prevalência de Adenoma das glândulas perianais por tipo de tumor....	24
Tabela 5 – Distribuição do nº de cães machos atendidos no HEV-FMV por raças (n>300) e do nº de tumores testiculares em cada raça.....	25
Tabela 6 – Probabilidade de uma raça ter tumor testicular em comparação com outra raça (odd ratio) relativamente às raças dos cães machos atendidos no HEV-FMV (n>300) e ao nº de tumores testiculares em cada raça.....	25
Tabela 7 – Dados recolhidos dos treze (n=13) animais utilizados no estudo.....	31
Tabela 8 – Protocolo de imunofluorescência adaptado Pedrosa et al. (2018).....	32
Tabela 9 – Anticorpos utilizados.....	32
Tabela 10 - Valores em percentagem da análise de leydigomas e a análise de parênquima normal/atrofia.....	35
Tabela 11 - Valores em percentagem da análise de seminoma e a análise de parênquima normal/atrofia.....	36
Tabela 12 - Valores em percentagem da análise de sertolinoma e a análise de parênquima normal/atrofia.....	36
Tabela 13 - Valores em percentagem da análise de leydigoma e seminoma e a análise de parênquima normal/atrofia. ....	37
Tabela 14 - Comparação da percentagem de áreas vasculares identificadas por Doppler cor os diferentes tipos de tumores. ....	37
Tabela 15 - Volume (mm <sup>3</sup> ) do tumor testicular medidos ecograficamente e calculados.....	39

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**Anti-CD31** – Anti-cluster of differentiation-31 (Anticorpo contra o conjunto de antígenos de diferenciação das células endoteliais)

**Anti- $\alpha$ SMA** – Anti-alpha smooth muscle Actin (Anti-actina-alfa do músculo liso)

**CPE** – Células progenitoras endoteliais

**ECs** – Células endoteliais

**EG-VEGF** – Endocrine gland derived vascular endothelial growth factor (Fator de crescimento do endotélio vascular derivado de glândula endócrina)

**HEV-FMV** – Hospital Escolar Veterinário

**MEC** – Matriz extracelular

**SRD** – Sem raça determinada

**TGF** – Transforming growth factor (Fator de transformação do crescimento)

**VEGF** – Vascular endothelial growth factor (Fator de crescimento do endotélio vascular)

**WHO** – World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)





## **I. RELATÓRIO DE ESTÁGIO**

A prática profissional e o treino como estudante de fim de curso e futuro Médico Veterinário é de importância primordial na experiência e formação de um profissional, tanto pelo desenvolvimento académico como pessoal.

O primeiro período do estágio curricular decorreu no Hospital Escolar de Animais de Companhia, da Universidade Complutense de Madrid entre 1 de outubro 2019 e 30 de novembro 2019. O estágio incidiu principalmente na área da Reprodução tendo sido orientado pelo Doutor Joaquín Cerdeira Lozano. Também tive a oportunidade de realizar rotações nos serviços de Cirurgia e Imagiologia. Durante este estágio, desenvolvi competências no que respeita a lidar com animais no ambiente clínico, a diagnosticar problemas reprodutivos e obstétricos mais comuns e a tratá-los por meios médicos ou cirúrgicos. Acompanhei cadelas durante o estro por forma a determinar o período de fertilidade máxima utilizando o doseamento da progesterona e a avaliação dos ovários por ecografia, observei a técnica de inseminação artificial intrauterina por endoscopia, a congelação de sêmen após analisada a qualidade do sêmen com programas informáticos como a Análise de Sêmen Assistido por Computador (CASA), e presenciei a técnica de injeções espermáticas intracitoplásmicas (ICSI).

A segunda parte do estágio foi no Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (HEV-FMV), onde tive a oportunidade de trabalhar com profissionais apaixonados por ensinar e por cumprir com o compromisso, não só com os animais mas também com os estudantes, tendo sido orientada pela Professora Doutora Luísa Mateus, e coorientada pelo Doutor Alexandre Trindade nas atividades laboratoriais necessárias para a realização desta dissertação, como os protocolos de Imunofluorescência.

No HEV-FMV, o estágio decorreu entre dezembro de 2019 e março de 2020, no qual realizei rotações em diferentes áreas da clínica dos animais de companhia: medicina interna, diagnóstico por imagem, cirurgia, medicina geral, reprodução e obstetrícia, unidade de isolamento de doenças infecciosas, oncologia e hospitalização/internamento.

No serviço de medicina interna tive a oportunidade de acompanhar casos de referência tanto de endocrinologia como gastroenterologia, o que me permitiu aplicar os conhecimentos adquiridos na interpretação dos resultados dos exames complementares e na discussão de possíveis diagnósticos diferenciais, bem como na escolha da terapêutica adequada.

Na área de diagnóstico por imagem consolidei os conhecimentos adquiridos na observação das características normais e patológicas em diferentes órgãos quer por ecografia quer por radiografia.

No serviço na Cirurgia realizei algumas atividades de rotina como: orquiectomias, ovariectomias, destarizações e extrações dentárias, assim como também tive a oportunidade de assistir a cirurgias ortopédicas e a cirurgias de urgência como o caso de piômetras.

Na Prática Geral, realizei atividades essenciais para uma primeira abordagem aos animais, como os cuidados preventivos, fazer uma correta anamnese e assim realizar um plano de diagnósticos diferenciais, e interpretar análises sanguíneas/urinárias, para finalmente proceder a um tratamento.

No serviço de Reprodução e Obstetrícia tive a oportunidade de realizar procedimentos para o diagnóstico de doenças reprodutivas ou manejo reprodutivo tais como a citologia vaginal, ecografia prostática e ovárica, diagnóstico e acompanhamento de gestação, cuidados neonatais e exame andrológico (toque rectal, recolha de sêmen, espermograma).

Na Unidade de Isolamento, consolidei os conhecimentos obtidos durante o curso sobre as principais doenças infecciosas nos animais de companhia, assim como os especiais cuidados a ter nesses casos, foram postos em prática.

Nas consultas de oncologia, assisti ao tratamento das neoplasias mais comuns nos animais de companhia, com diferentes protocolos quimioterápicos, assim como ao tratamento para o manejo da dor.

Por último, onde ajudei a tratar situações agudas (como as convulsões) durante dias e noites: o internamento. Serviço essencial para o conhecimento de cuidados intensivos dos animais e aprendizagem da correta utilização dos protocolos de fluidoterapia e de diferentes tratamentos farmacológicos aplicados nos animais hospitalizados.



## **II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1. Biologia tumoral**

As neoplasias são um crescimento tecidual novo composto por células derivadas de tecidos normais, mas sofreram alterações genéticas hereditárias que lhe permitiram não responder à regulação do crescimento, levando à sua expansão por além dos limites anatómicos. O grau e o estágio do tumor são indicadores do risco do mesmo relativamente à sobrevivência do hospedeiro, assim como ajudam na definição da estratégia terapêutica ideal (Zachary e McGavin 2011).

O processo de desenvolvimento tumoral compreende três fases: iniciação, promoção e progressão. Na primeira etapa, a iniciação, é a introdução de alterações genéticas irreversíveis nas células por ação de agentes de iniciação ou iniciadores. Os iniciadores são agentes físicos ou químicos carcinogênicos que danificam o ADN celular. Numa segunda fase, ocorrendo um estímulo promotor do crescimento celular, as células com alteração do ADN vão multiplicar-se, transmitindo as características adquiridas à sua descendência. Durante esta fase não há lugar a novas alterações do ADN, visto que os promotores não são mutagênicos, mas alteram a expressão genética tanto das células iniciadas como nas células não iniciadas, para assim criar um microambiente ideal para o crescimento das primeiras. Esta fase de promoção pode ser reversível. A progressão, é a etapa final do desenvolvimento tumoral, diz respeito à conversão do tumor benigno em maligno e metastático. Esta conversão é irreversível, muito complexa e com múltiplos processos envolvidos, com efeitos tanto na genética como na epigenética das células tumorais e no seu microambiente. Os marcadores desta última etapa são a instabilidade cariotípica e o aumento da heterogeneidade das células tumorais (Zachary e McGavin 2011).

As características microscópicas e macroscópicas permitem classificar os tumores como benignos e malignos. Os parâmetros utilizados para esta caracterização são: a diferenciação celular, a taxa de crescimento e a presença de invasão local, assim como de metástases.

No tumor benigno as células tumorais mantêm-se com aspeto bem diferenciado e com estrutura similar ao tecido de origem, não existindo invasão local nem metástases. São tumores de expansão lenta e progressiva com raras figuras mitóticas. Já no caso de tumor maligno, usualmente existe perda de diferenciação, taxa de crescimento instável (de lenta a rápida) e numerosas figuras mitóticas. Um tumor maligno pode invadir tecidos normais vizinhos, mas também pode existir uma invasão



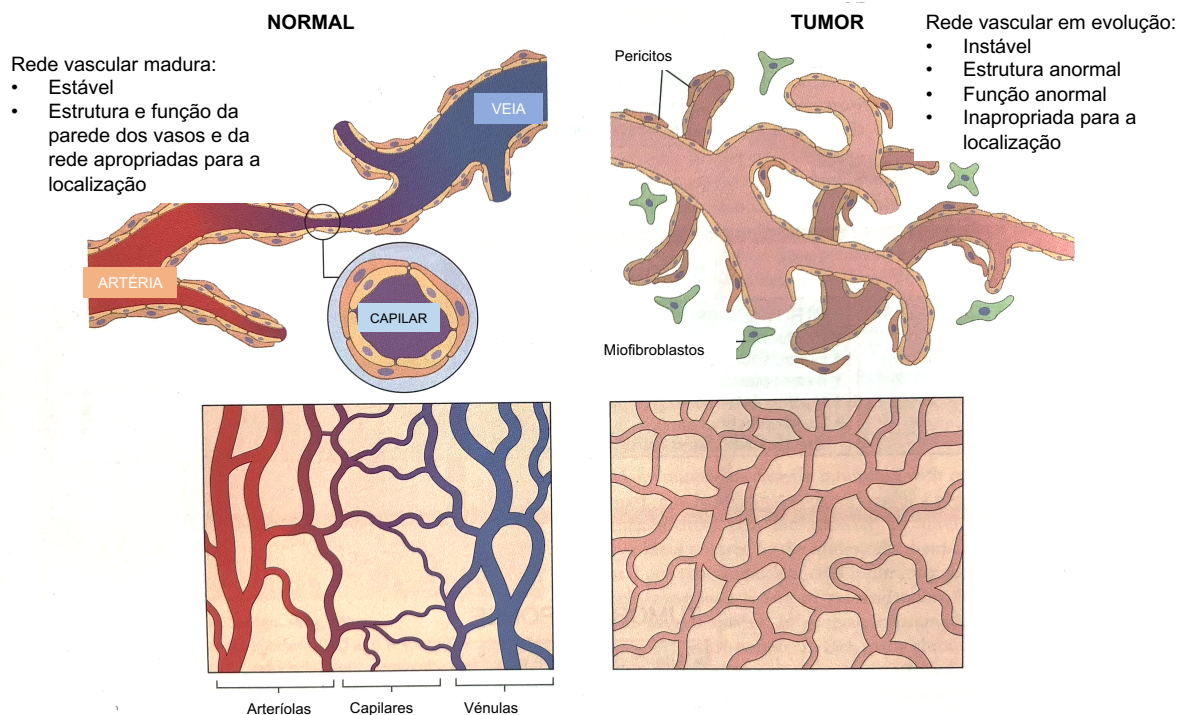
para a corrente sanguínea ou linfática, causando alterações em zonas distantes do tumor primário, o que é um critério definitivo de malignidade (Lodish et al. 2001; Ruddon 2007; Plank e Sleeman 2003; Zachary e McGavin 2011).

Os tumores podem desenvolver-se em diferentes tecidos. Assim sendo, os tumores são categorizados segundo a sua origem, podendo ser classificados em carcinomas, sarcomas ou neoplasias dos tecidos de células redondas. Os carcinomas são tumores com origem nas células epiteliais. Os sarcomas formam-se a partir de células mesenquimais, tendo origem em tecidos conjuntivos, tais como, osso, músculo, tecido adiposo, vasos sanguíneos ou cartilagem. As neoplasias das células redondas têm origem nos tecidos hematopoético, incluindo o tecido linfóide. Incluem-se neste grupo os linfomas, leucemias e mielomas (Alberts et al. 1994; King 1996).

### **1.1 Vascularização tumoral**

A vascularização é conformada por uma rede de vasos sanguíneos que liga o coração a todos os órgãos e tecidos de um organismo. Os vasos sanguíneos são compostos por uma monocamada de endotélio, que se organiza de maneira a formar um lúmen, onde circula o sangue. O endotélio encontra-se externamente revestido por células de suporte, como os pericitos nos capilares sanguíneos. No caso dos vasos de maior calibre o endotélio apoia-se em células de tecido muscular liso, que formam a camada média. O endotélio também possui uma membrana basal que o separa do tecido circundante (Iso et al. 2003; Plank e Sleeman 2003; Roy Bicknell et al. 1997).

A vascularização tumoral se caracteriza por apresentar um grande número de anastomoses arteriovenosas, muitas trifurcações e ramos com diâmetros irregulares (Russo et al. 2012). A vasculatura tumoral, ilustrada na Figura 1, é descrita como caótica e tortuosa, o que contraria a dos órgãos não tumorais, que, como já referido, tem uma ordem de ramificação organizada e regular (Karar e Maity 2011). Os vasos dos tumores têm uma elevada permeabilidade devido ao revestimento endotelial ser parcial e a membrana basal estar fragmentada, levando a um aumento da pressão do fluido intersticial, o que, junto com a irregularidade nos diâmetros do lúmen, fazem com que a vasculatura tumoral resulte numa perfusão heterogênea (Eichhorn et al. 2007; Kim et al. 2010). Além disso, tendo uma cobertura anormal ou diminuída de pericitos, os vasos dos tumores vazam fluido e sangue para o tecido circundante (Russo et al. 2012).



**Figura 1 – Comparação da vascularização normal e a vascularização tumoral adaptado de Zachary e McGavin (2011).**

## 1.2 Angiogénese tumoral

O crescimento e a progressão dos tumores, assim como a sua capacidade de metastização, estão fortemente relacionadas com o processo de angiogénese, a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, os quais fornecem oxigénio e nutrientes às células tumorais, que são altamente proliferativas (Roy Bicknell et al. 1997; Bergers e Benjamin 2003; Russo et al. 2012).

Para que ocorra o crescimento exponencial e progressão dos tumores, é preciso passar de uma fase hiperplásica (avascular) para uma neoplásica (vascular), o que é denominado como “angiogenic switch”, no qual o equilíbrio local entre fatores pro-angiogénicos e anti-angiogénicos é alterado (Hanahan e Folkman 1996; Plank e Sleeman 2003).

Os fatores angiogénicos têm mecanismo de ação que diferem consoante a sua origem e estímulos de produção. Estes fatores podem originalmente provir de células tumorais, células do estroma, ou do microambiente criado pelo tumor, como as células

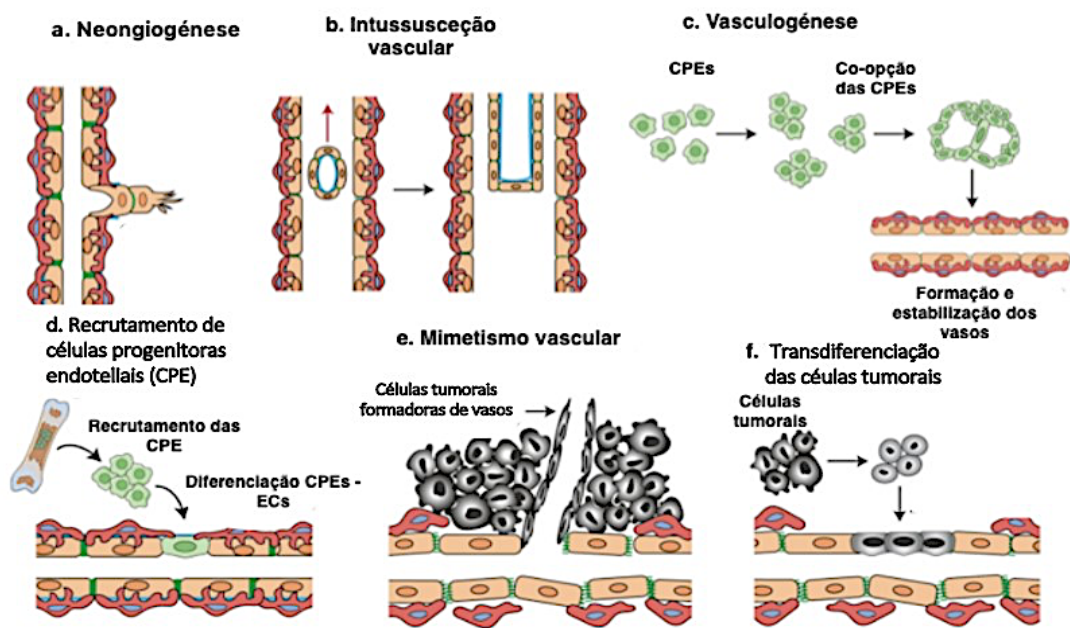
inflamatórias (Coussens e Werb 2001; Pelengaris et al. 2002; Plank e Sleeman 2003; Russo et al. 2012).

A angiogénese tumoral pode ser avaliada através da densidade microvascular do tumor (DVT). A DVT é um parâmetro que funciona como indicador de prognóstico nos tumores que apresentam uma angiogénese significativa. Uma densidade vascular elevada está normalmente associada a malignidade tumoral e a metástases, o que resulta no agravamento do prognóstico (Withrow e Vail 2006; Russo et al. 2012).

### **1.3 Mecanismos da angiogénese**

Quando o fornecimento de oxigénio (hipoxia) e nutrientes nas células tumorais é insuficiente para a sua taxa de multiplicação, existem mecanismos que melhoram o aporte sanguíneo, podendo existir um ou vários destes mecanismos num mesmo tumor. Os mecanismos estão ilustrados na Figura 2, e são descritos como: (Hyman 1993; Iso et al. 2003; Lugano et al. 2020)

- A neoangiogénese, que parece ser a forma predominante de estabelecer a vascularização nos tumores.
- A intussusceção vascular, que consiste na divisão longitudinal de um vaso sanguíneo em dois.
- A vasculogénese, que consiste no recrutamento de células derivadas da medula óssea. Uma rede vascular inicial é formada durante o desenvolvimento embrionário e, posteriormente, pode contribuir para a subsequente formação de vasos em alguns tecidos.
- A cooptação dos vasos existentes consiste num sequestro da vasculatura pelas células tumorais que crescem ao longo dos vasos.
- O mimetismo vascular, onde as células tumorais também podem diferenciar-se e formar estruturas que se assemelham a canais pseudovasculares com capacidade de levar o fluxo.



**Figura 2 – Mecanismos de formação de vasos, a. Angiogénese germinativa. b. Angiogénese intussusceptiva. c. Vasculogénese. d. Recrutamento de células progenitoras endoteliais. e. Mimetismo vascular. F. Trans-diferenciação das células estaminais do cancro - Adaptado de Lugano et al. (2020)**

#### 1.4 Reguladores da angiogénese tumoral

A angiogénese tumoral, assim como a fisiológica, vai depender de moléculas capazes de induzir o crescimento de novos vasos. Esta indução resulta na activação das células endoteliais e dos perícitos para proliferar, utilizando vias celulares, envolvidas em processos de adesão celular, migração, invasão, assim como metabolismo e sobrevivência das células endoteliais (Karar e Maity 2011). Como já referido, o “angiogenic switch”, a transição de um fenótipo pré-vascular para tumor vascular, desvia o equilíbrio a favor da angiogénese, promovendo as atividades de fatores pró-angiogénicos ou inibindo fatores anti-angiogénicos (DeLisser et al. 1997; Lugano et al. 2020). Os fatores anti-angiogénicos endógenos correspondem às proteínas e fragmentos proteicos de componentes de matriz extracelular e membrana basal. Por outro lado, os fatores de crescimento, as citocinas e outras proteínas não-derivadas da matriz inibem diretamente a proliferação e migração das células endoteliais (Iso et al. 2003). As células endoteliais são fisiologicamente quiescentes, sendo ativadas por fatores pró-angiogénicos, entre os quais se encontra o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e outras famílias angiogénicas importantes, como o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas B (PDGF-B), as angiopoietinas (Angiopoietin-1 e Angiopoietin-2), o TGF  $\beta$  e as metaloproteases (MMPs) (Iso et al. 2003; Withrow e Vail 2006). Estes fatores, principalmente o VEGF,

são regulados através da via de sinalização Notch, a qual interfere especialmente no processo de angiogénese, assim como na diferenciação das células endoteliais e as células do músculo liso (SMCs) (Iso et al. 2003; Lugano et al. 2020)

No homem e no rato, o tecido testicular normal expressa VEGF, mais especificamente nas células de Leydig e de Sertoli. No entanto, o VEGF encontra-se aumentado nos tumores testiculares (Anand et al. 2003; Jennewein et al. 2018). No homem, o fator de crescimento endotelial vascular derivado de glândulas endócrinas (EG-VEGF), que numa situação normal está presente exclusivamente na glândula adrenal e nos testículos, encontra-se significativamente aumentado nos casos de leydigoma, em comparação com o seminoma e o sertolinoma. O EG-VEGF parece ter um papel importante na vascularização dos tumores das células de Leydig, que podem ter uma densidade microvascular até 3,2 vezes maior que os seminomas. Na medicina humana está descrito que os seminomas apresentam como principais vasos tumorais pequenas vénulas finas (Samson et al. 2004; Jennewein et al. 2018).

## **2. Tumores testiculares no cão:**

### **2.1 Incidência:**

Os tumores testiculares são o segundo tipo de tumores mais prevalente nos cães, sendo os mais comuns os tumores cutâneos. Os tumores testiculares representam mais de 90% de todos os tumores genitais nos cães, apresentando uma incidência maior do que em qualquer outra espécie (Dhaliwal et al. 1999; Withrow e Vail 2006; Hohšteter et al. 2014). O desenvolvimento de neoplasia é mais frequente no testículo direito, o que poderá estar relacionado com aspetos embrionários (Maiolino et al. 2004).

Os principais componentes celulares dos testículos são as células germinativas (espermátogonia, espermátócito primário e secundário, e espermátide) e as células somáticas (Sertoli e Leydig) (Meuten 2016). Em termos histológicos, os três tipos de tumores mais frequentemente diagnosticados são o sertolinoma (células de Sertoli), o leydigoma (células de Leydig ou intersticial) e o seminoma (células germinativas). No mesmo testículo podem estar presentes mais do que um tipo de tumor, o que ocorre em 40% dos casos (Dhaliwal et al. 1999; Doxsee et al. 2006; Hohšteter et al. 2014).

O leydigoma e o seminoma apresentam uma prevalência semelhante (Grieco et al. 2008; Švara et al. 2014). Embora o sertolinoma seja menos prevalente, a sua ocorrência aumenta drasticamente em animais criptorquídeos (Kutzler 2011; Quartuccio et al. 2012)

### **2.2 Fatores de risco:**

#### **Idade:**

Os tumores testiculares são mais frequentemente diagnosticados em cães geriátricos (idade média de 10 anos) (Maiolino et al. 2004; Withrow e Vail 2006; Nødtvedt et al. 2011; Peters et al. 2001). No entanto, o sertolinoma é diagnosticado, em média, em cães mais jovens (8,6 anos) comparativamente com outros tipos de tumores testiculares (Dhaliwal et al. 1999; Nødtvedt et al. 2011).

#### **Localização do testículo:**

Em condições normais a descida testicular para o escroto começa nos primeiros oito a dez dias após o nascimento do cão, processo que deverá completar-se antes do encerramento do anel inguinal, que ocorre por volta dos seis meses de idade (Wanke e Gobello 2006). A retenção testicular na cavidade abdominal ou na zona inguinal é denominada como criptorquidismo, sendo bastante comum em cães, e está principalmente associada a causas genéticas (Quartuccio et al. 2012). A probabilidade de um cão criptorquídico desenvolver um sertolinoma ou um seminoma é 5 vezes e 3 vezes maior, do que a população de cães em geral, respetivamente (Kutzler 2011). Curiosamente, nenhuma relação foi detetada relativamente aos leydigomas (Nødtvedt et al. 2011). Raças como o Boxer, Chihuahua, Cocker Spaniel, Bulldog Inglês, Pastor Alemão, Maltês, Miniatura Dachshund, Bobtail, Pequínês, Sptiz Alemão, Caniche, Pastor de Shetland e Yorkshire Terrier parecem apresentar predisposição para o criptorquidismo (Dhaliwal et al. 1999; Yates et al. 2013).

A localização fisiológica dos testículos no escroto proporciona uma temperatura inferior à do resto de corpo (2 C° inferiores), o que é fundamental para a espermatogénese e o armazenamento dos espermatozoides (Cunningham e Kleint, 2009). Outros aspetos anatómicos que ajudam no processo de termorregulação testicular são o plexo pampiniforme, a túnica de dartos e o músculo cremáster (Wanke e Gobello 2006). O plexo pampiniforme é conformado por uma rede de veias testiculares, que recobrem a artéria testicular, para assim reduzir a temperatura da irrigação testicular (Englar 2019). No caso dos animais criptorquídeos, os testículos retidos sofrem uma degenerescência do epitélio germinativo por estarem expostos à temperatura corporal, o que resulta numa alteração celular com tendência para o desenvolvimento de sertolinoma (Ciaputa et al. 2012; Kutzler 2011; Withrow e Vail 2006). Nos testículos retidos na zona inguinal, devido à temperatura ser superior à do escroto, mas inferior à da cavidade abdominal, surgem predominantemente seminomas. Já relativamente aos leydigomas, não foi identificada nenhuma relação com a temperatura, pois são menos frequentes em animais criptorquídeos (Dhaliwal et al. 1999).

#### **Raça:**

Embora alguns autores refiram que o aparecimento dos tumores pareça estar aumentado em animais sem raça determinada, outros autores apontam uma predisposição em raças como o Boxer, Collie, Pastor Alemão, Galgo Afegão, Weimaraner, e Pastor Shetland (Dhaliwal et al. 1999; Withrow e Vail 2006). Todavia, o Boxer é uma raça com alto risco em termos de cancro no geral, pelo que pode estar sobrerrepresentada (Withrow e Vail 2006). O estudo geral sobre o cancro em cães de determinadas raças sugeriu que, embora raças como Boieiro de Berna, o Boxer e o Golden Retriever possam ter uma arquitetura genética do cancro semelhante ao das restantes, existe a possibilidade que o risco conferido pelos alelos predisponentes de tumor nestas raças seja maior (Dobson 2013). Em raças como o Pastor de Shetland e o Collie, a probabilidade de desenvolvimento de tumores testiculares pode ser cinco vezes superior quando comparada com outras raças (Nødtvedt et al. 2011).

#### **Exposição a agentes cancerígenos ambientais:**

Tem sido associada a um aumento da incidência de seminomas em cães de trabalho militares que serviram na Guerra do Vietname (Withrow e Vail 2006).

### **2.3 Caracterização macroscópica e classificação histológica dos tumores testiculares nos cães:**

Os tumores testiculares podem ser caracterizados através do aspeto macroscópico. No entanto, a classificação é feita através das características histológicas, as quais indicam a origem celular da neoplasia (Withrow e Vail 2006).

#### **Caracterização macroscópica:**

Dentro das características físicas mais comumente observadas nos principais tipos de tumores, quando comparadas com o tecido testicular não alterado, os leydigoma têm uma tendência para ter um aspeto quístico com uma cor amarelo-laranja, já os seminomas tendem a aparecer de cor esbranquiçada. Os sertolinomas tendem a ser firmes, esbranquiçados ou acinzentados e com lobulações que podem sentir-se à palpação (Englar 2019; Meuten 2016).

**Classificação histológica dos tumores testiculares nos cães, pela Organização Mundial de Saúde (WHO) (Kennedy et al. 1998) consiste em três grupos:**

#### **Tumores do estroma gonadal:**

- i Sertolinoma ou tumores das células de Sertoli (células de suporte).
- ii Leydigoma ou tumor das células de Leydig (células do interstício).
- iii Gonadoblastoma.
- iv Tumores de diferenciação intermédia entre células de Sertoli e Leydig.

### **Tumores das células germinativas**

- i Seminoma.
- ii Carcinoma embrionário.
- iii Teratoma.

### **Tumores primários de origem variada:**

- i Mesotelioma.
- ii Tumores vasculares.
- iii Linfoma.

## **2.4 Anamnese e Sinais Clínicos.**

Os testículos devem ser avaliados pela sua presença no escroto, além da sua simetria em relação um ao outro, a sua forma, tamanho e consistência. Na maioria dos casos, os cães com tumores testiculares são assintomáticos (Englar 2019). Os sinais clínicos associados aos tumores testiculares são variáveis e podem ser causados pela presença física do próprio tumor primário, por metástases, ou então como consequência de síndromes paraneoplásicas, como acontece por vezes nos sertolinomas (Lawrence 2013).

Cerca de 50 a 70% dos sertolinomas secretam estrogénios, o que pode causar um conjunto de alterações que é denominado como a síndrome de feminização. Esta síndrome contempla sinais cutâneos, como a alopecia bilateral e simétrica com hiperpigmentação do prepúcio, escroto e flancos juntamente com alterações genitais, como a galactorreia, ginecomastia, prepúcio pendular, atrofia do pénis ou do testículo contralateral e metaplasia escamosa da próstata (Quartuccio et al. 2012; Englar 2019). O agravamento da síndrome pode resultar em alterações a nível medular (mielotoxicidade), devido à persistência de concentrações elevadas de estrogénios, resultando numa hipoplasia da medula óssea, que em termos clínicos resulta em alterações hematológicas como anemia, leucopénia e pancitopénia (discrasia sanguínea) (Marshall 2018; Noakes et al. 2017).

Os leydigomas estão muito raramente associados ao aumento dos níveis de testosterona. Quando tal acontece, pode induzir alterações nos órgãos influenciados pela testosterona, como a próstata e as glândulas perianais (Johnston et al. 1991; Paepe et. al 2016).

Outros sinais clínicos reportados em cães com tumores testiculares incluem hematúria, torção do cordão espermático (principalmente nos intra-abdominais) e hemoperitoneu (Dhaliwal et al. 1999).



## **2.5 Diagnóstico:**

Como já referido, a maioria dos tumores testiculares são assintomáticos o que leva a que frequentemente sejam achados acidentais nos cães idosos, como é o caso dos leydigomas e seminomas que são frequentemente encontrados nos testículos escrotais. Já no caso dos sertolinomas pode suspeitar-se se existir a presença de sinais associados com a síndrome paraneoplásica (Paepe et. al 2016).

No entanto, a primeira suspeita clínica de neoplasia testicular ocorre na palpação testicular durante o exame físico. A avaliação testicular através da palpação é uma parte importante do exame físico de qualquer paciente masculino inteiro, normalmente esta é caracterizada por não causar dor ou desconforto em cães saudáveis (Withrow e Vail 2006). Adicionalmente, os testículos saudáveis apresentam uma consistência firme, mas compressível e são móveis dentro do escroto. Deste modo, quando existe desconforto ao toque, ou outras alterações, como aumento de tamanho, consistência firme, presença de nódulos e aderências, poder-se-á suspeitar de uma neoplasia (Withrow e Vail 2006; De Gier et al. 2009).

A ecografia testicular é uma ferramenta útil para diferenciar alterações de origem neoplásica e de não neoplásicas (por exemplo, orquite, epididimite e torção testicular ou necrose tecidual) (Vital et al. 2007; Englar 2019). No entanto, não fornece informação consistente para o diagnóstico definitivo, pelo que é necessário relacionar com a história reprodutiva do animal, exames laboratoriais ou outras técnicas de diagnóstico, como a citologia aspirativa por agulha fina. O diagnóstico definitivo é feito através do exame histopatológico (Withrow e Vail 2006; Nødtvedt et al. 2011).

Os cães de valor reprodutivo que realizem exames andrológicos podem apresentar alterações na fertilidade, como a azoospermia e/ou a oligospermia (Ciaputa et al. 2012). Para um diagnóstico presuntivo prévio à orquiectomia, poderá ser realizada uma aspiração com agulha fina para a citologia (Withrow e Vail 2006; Salomão e Domingos 2011).

Existem outros exames laboratoriais complementares que também podem ser realizados, como a realização de uma citologia prepucial no caso de suspeita de ação estrogénica. Se considera normal menos de 20% de células superficiais (Withrow, Stephen e Vail 2006; Ciaputa et al. 2012; Dreimanis et al. 2012).

Prévio à confirmação histopatológica de neoplasia testicular, a sua evolução é estadiada através de exames complementares, avaliando a presença de possíveis metástases. Estes incluem exames ao sangue (hematologia completa e bioquímicas), urianálise, radiografia torácica e a ecografia abdominal. No caso de cães com evidência clínica ou mielotoxicidade grave, deve ser realizado um perfil de coagulação (Dhaliwal

et al. 1999; Withrow e Vail 2006). Também pode ser efetuado um toque retal, para eliminar doença concomitante das glândulas perianais e prostática (Dhaliwal et al. 1999; Englar 2019).

## **2.6 Terapêutica e prognóstico:**

A orquiectomia é o tratamento de eleição para os tumores testiculares, sendo que orquiectomias unilaterais podem ser consideradas em animais de elevado valor reprodutivo. É uma cirurgia de rotina que é bem tolerada pela maioria dos cães. No entanto, existem alguns efeitos secundários da mesma, como a diminuição do metabolismo basal com consequente aumento de peso (Houlihan 2017).

A quimioterapia, como alternativa à cirurgia, raramente é realizada como tratamento de eleição (a orquiectomia tem grande sucesso terapêutico). No entanto, tem alguma eficácia no caso de tumores malignos, no tratamento de metástases, utilizando-se compostos como a cisplatina, a bleomicina, o metotrexato, a vinblastina e a ciclofosfamida (Dhaliwal et al. 1999; Withrow e Vail 2006).

A maioria dos tumores testiculares primários possuem um excelente prognóstico se não houver evidência de metástases ou mielotoxicidade (elevada morbidade e mortalidade associadas à infeção secundária ou à diarreia sanguinolenta), o que é justificado pelo facto de serem tumores confinados localmente (Restrucci et. al 2003). No entanto, nos seminomas e sertolinomas, está descrito que menos de 15% metastiza para o linfonodo regional (inguinais, retroperitoneal, ilíacos, para-aórticos ou sublumbar) ou, menos frequente, para locais mais distantes como os rins, o pâncreas, os pulmões e o baço. Todavia, metástases em órgãos como o cérebro e olhos num caso de seminoma primário também foram registadas (Lawrence 2013; Withrow e Vail 2006; Kim et al. 2010; Quartuccio et al. 2012; Noakes et al. 2017; Kumar et al. 2018).

Os leydigomas são normalmente diagnosticados como tumores benignos com baixa incidência de metastização. No entanto, têm sido registados casos de metástases no músculo esquelético com origem no tumor primário das células de Leydig (Togni et al. 2015). Os leydigomas apresentaram uma expressão imunohistoquímica intensa para a E-Caderina, uma proteína transmembranária envolvida na adesão celular, o que se traduz numa menor mobilidade celular resultando num menor potencial metastático para os leydigomas comparado com o seminoma e o sertolinoma (Ciaputa et al. 2014).

O prognóstico pode agravar-se nos casos de leydigomas que estejam associados a alterações a nível prostático, tais como a presença de quistos/abcessos ou então em casos de obstrução uretral (Dhaliwal et al. 1999; Englar 2019). Todavia, a torção do cordão espermático também é um dos grandes riscos dos tumores

testiculares, sobretudo em animais com testículos ectópicos, o que está intimamente ligado ao aparecimento de sertolinomas (Quartuccio et al. 2012; Paepe et al. 2016).

No geral, a sobrevida dos cães com doença metastática varia entre 5 meses a mais de 31 meses, para cães tratados com quimioterapia sistêmica (Ciaputa et al. 2012).

## **2.7 Comparação com a Medicina Humana.**

As neoplasias testiculares no homem são raras, sendo que mais de 90% correspondem a tumores das células germinativas, categorizados como seminomas e não-seminomas (Kamat et al. 2019; Nicholson et al. 2019). Os seminomas nos cães são utilizados como ferramenta de estudo na medicina humana, visto que apresentam um potencial metastático similar aos seminomas humanos, mas raramente metastizam (Kim et al. 2010). Cerca de 65-85% dos seminomas são localizados, enquanto que 60-70% dos não-seminomas metastizam (Kamat et al. 2019). Os tumores testiculares no homem apresentam características semelhantes aos encontrados nos cães. No entanto, diferem significativamente na capacidade de metastização, e na altura em que são diagnosticados, sendo mais frequentes em homens jovens (entre os 20 e os 40 anos de idade) enquanto que nos cães é mais frequente após os 10 anos (Dhaliwal et al. 1999; Nødtvedt et al. 2011; Kamat et al. 2019). Nas crianças, os tumores testiculares que predominam são os carcinomas embrionários e os teratomas, já os sertolinomas e os leydigomas são muito raros no homem (Cummings et al. 1994; Dhaliwal et al. 1999).

O desenvolvimento de tumores testiculares no homem está associado à disgenesia testicular (Síndrome da feminização testicular, síndrome de Klinefelter), assim como a situações de trauma testicular, infeções, predisposição hereditária, alterações endócrinas e a exposições ambientais a químicos e fármacos (Nødtvedt et al. 2011). A perda de sensibilidade aos andrógenos, devido à mutação no gene responsável pela estrutura do recetor de andrógeno também pode aumentar o risco de desenvolvimento tumoral (Borre et al. 1998; Kim et al. 2010; Salomão e Domingos 2011; Thorvaldsen et al. 2012).

No entanto, os tumores testiculares no homem têm um prognóstico favorável, aproximadamente 70% a 80% são tratados com quimioterapia à base de cisplatina (Kim et al. 2010; Nødtvedt et al. 2011).

## **3. Ecografia testicular:**

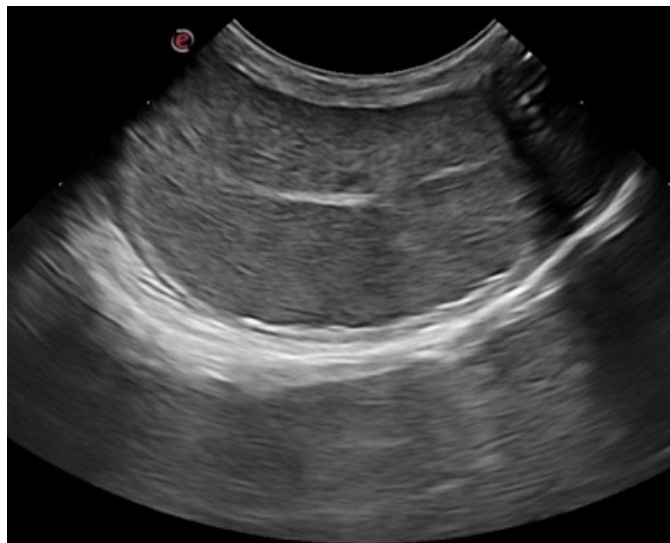
O exame ultrassonográfico simples permite de maneira não invasiva, obter informações sobre a ecotextura dos testículos, a presença de massas, assim como o tamanho, volume e posição. A avaliação ecográfica é o método de eleição para a obtenção de informações necessárias para a preparação da cirurgia, principalmente em

casos de testículos retidos não palpáveis para conhecer a sua localização (Huang e Sidhu 2012).

No entanto, as informações obtidas são estritamente morfológicas, não possibilitando qualquer estudo funcional, pelo que não proporciona um diagnóstico definitivo. Todavia, ajuda na diferenciação de alterações neoplásicas de outras não neoplásicas, tais como orquite, epididimite, torção testicular, isquemia, atrofia, hérnia intestinal e edema escrotal, com sensibilidade de 98% a 100% (Salomão e Domingos 2011).

### **3.1 Avaliação testicular**

Os testículos devem estar localizados no escroto, o que permite que sejam avaliados diretamente com sondas de alta frequência. São moderadamente ecogênicos e com uma ecotextura uniforme e granular, apresentando uma linha hiperecogênica central que representa o mediastino testicular, ilustrado na figura 3. A cabeça do epidídimo, que se encontra cranialmente, apresenta a mesma ecotextura do estroma testicular, enquanto que a cauda do epidídimo se apresenta mais hipoeecogênica (Englar 2019; Wrigley 2010).



**Figura 3 – Aspeto ecográfico do testículo normal, sinalando o mediastino testicular.**

Os achados ultrassonográficos nos tumores testiculares vão desde pequenos nódulos circunscritos a grandes massas complexas, com alteração da anatomia normal do testículo (Johnston et al. 1991). A apresentação ultrassonográfica das neoplasias testiculares é muito variável, podendo ser observadas lesões focais ou multifocais, o que dificulta o diagnóstico, no caso da presença de tumores mistos (Salomão e Domingos 2011). Um estudo sobre as características ecográficas dos leydigomas,

caracteriza-os como uma massa infracentimétrica hipoecogénica isolada, associada a uma hipervascularização intrínseca (Maxwell et al. 2016).

A ecografia também permite a realização de biópsias ecoguiadas de massas/nódulos testiculares ou escrotais, quando o valor reprodutivo de um animal assim o justifique (Lawrence 2013).

### **3.2 Doppler-Cor**

No homem, a utilização do Doppler auxilia no diagnóstico diferencial das massas intratesticulares. Nos animais, não existem parâmetros de doppler fluxométricos precisos que possam ser utilizados na prática diária pelo médico veterinário, mas continua a ser uma ferramenta-chave para a avaliação vascular dos testículos, pois permite a descrição da estrutura vascular, a presença ou ausência de fluxo sanguíneo no órgão e a avaliação da direção e velocidade do fluxo sanguíneo (Souza et al. 2014).

O Doppler-Cor é utilizado em combinação com o Power doppler, o qual é uma técnica que descreve a presença de fluxo sanguíneo, num mapa de cores, através da força com que o sinal é exibido. Em comparação com o Doppler-Cor, é mais sensível que para a deteção e demonstração do fluxo sanguíneo baixo, mas não fornece informações sobre a direção do fluxo (Bigliardi et al. 2019).

#### **IV. OBJETIVOS**

Os objetivos deste estudo foram:

- Avaliar a prevalência dos três tipos de tumores testiculares mais comuns em cães através de um estudo retrospectivo tendo em conta a distribuição das raças que aparecem mais frequentemente.
- Avaliar fatores de risco no surgimento de tumores testiculares.
- Caracterizar o padrão vascular segundo a densidade nos três tipos mais comuns de neoplasias testicular por Doppler Cor.
- Validar a utilização de Doppler Cor no diagnóstico diferencial de neoplasia testicular através da imunohistoquímica.

## **V - PREVALÊNCIA DE TUMORES TESTICULARES EM CÃES OBSERVADOS NO HOSPITAL ESCOLAR DA FMV.**

### **1. MATERIAL E MÉTODOS.**

#### **1.1 Amostragem**

Para este estudo foram utilizados os dados de 31710 cães machos registrados no software clínico Guruvet<sup>®</sup>, durante o período 2013-2019. Neste grupo está incluído animais atendidos no HEV-FMV e amostras de testículos enviadas por outras clínicas/hospitais. Desta população foram enviados para análise hepatológica testículos de 335 cães, tendo sido confirmado o diagnóstico de tumor testicular em 246 cães. A maioria das amostras enviadas (n=159) foram de animais atendidos no HEV-FMV, sendo que 87 amostras foram enviadas por outras clínicas/hospitais veterinários. Dos 31710 cães registrados foi possível obter informação sobre o estado reprodutivo. Dos 246 cães com tumores testiculares foram recolhidas informações como a raça (n=245), e a idade (n=221). No caso dos animais com tumor atendidos no HEV-FMV (n=159), foi possível obter informação adicional como o peso, a presença de adenoma das glândulas perianais (n=49) e de criptorquidismo (n=23).

#### **1.2 Análise estatística**

Os dados recolhidos foram organizados de forma a criar uma base de dados e analisados com o programa *Microsoft Office Excel*<sup>®</sup>.

Numa primeira fase realizou-se uma análise descritiva dos dados dos cães com o diagnóstico de tumor testicular confirmado por histopatologia, calculou-se a percentagem com que aparecem os tumores testiculares, assim como também a prevalência dos três tipos de tumores, os quais foram relacionados com os diferentes parâmetros (idade, peso, raça, etc.). A comparação entre as prevalências dos diferentes tipos de tumores foi feita pelo teste exato de Fischer.

Para a análise estatística foi utilizado o programa *Statistical Analysis System*<sup>®</sup> (SAS), pelo qual se comparou o risco estimado (*odd ratio*) entre raças para a ocorrência de tumores, considerando como níveis de significância p-value <0,01 (\*) e p-value <0,05 (\*\*).

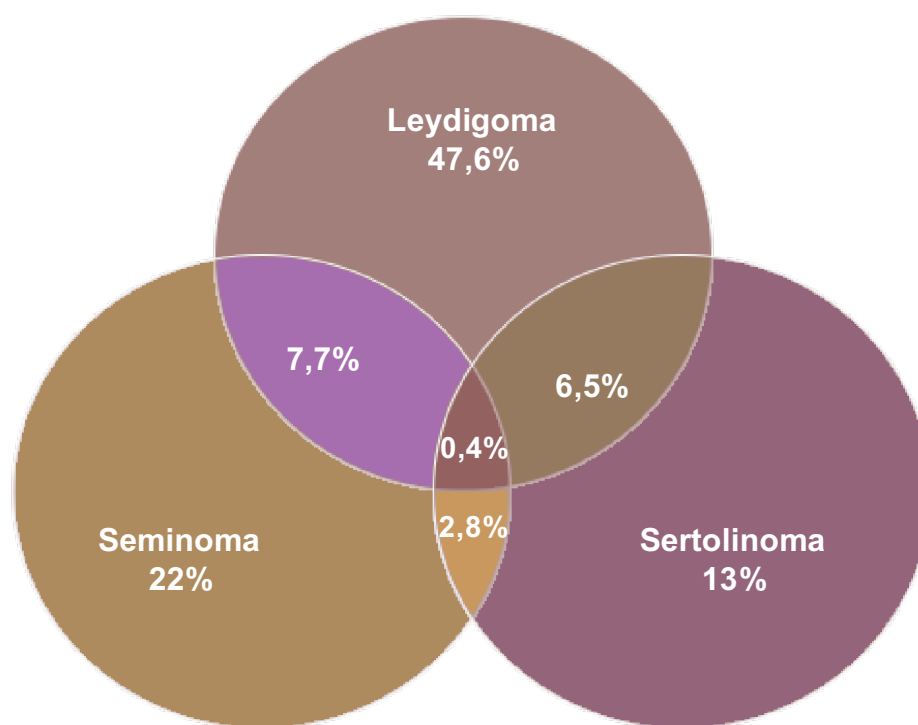
## **RESULTADOS.**

## 2.1 Animais com tumores testiculares

De 31710 cães machos registrados no HEV-FMV, 246 animais tiveram diagnóstico histopatológico de tumor testicular (0,8%). Os tumores testiculares representaram 73,4% das alterações histológicas observadas em testículos (n=335). A análise histopatológica dos testículos pertencentes aos 246 animais com tumores testiculares (Figura 4) revelou que, o tipo de neoplasia mais frequente foi o leydigoma, com cento e dezassete animais a apresentarem só leydigoma (47,6%) ( $p < 0,001$ ), seguido pelo seminoma, com cinquenta e quatro animais só com seminoma (21,9%) ( $p < 0,001$ ), e o menos prevalente, o sertolinoma, com trinta e um animais só com sertolinoma (13,0%) ( $p < 0,001$ ).

Os tumores mistos foram observados em quarenta e três casos (17,4%), sendo que em dezanove dos casos foi identificado o conjunto de leydigoma e seminoma (7,7%), em dezasseis dos casos foram identificados leydigoma e sertolinoma (6,5%) e, em sete casos foram identificados seminoma e sertolinoma (2,8%). Por último, só um caso com os três tipos de tumores foi identificado (0,04%).

Catorze (5,7%) dos animais apresentaram tumor nos dois testículos e trinta e oito (15,4%) tinham mais do que um tipo de tumor no mesmo testículo.



**Figura 4 – Prevalência dos diferentes tipos de tumores testiculares.**



**Tabela 1 – Número de casos por tipo de neoplasia.**

<b>TIPO DE NEOPLASIA</b>	<b>Nº de casos</b>
Leydigoma	108
Seminoma	53
Sertolinoma	31
Leydigoma e Seminoma	16
Leydigoma e Sertolinoma	15
Leydigomas bilaterais	9
Seminoma e Sertolinoma	6
Leydigoma / Seminoma	3
Leydigoma, Seminoma e Sertolinoma	1
Leydigoma / Sertolinoma	1
Sertolinoma bilateral	1
Seminoma / Sertolinoma	1
Seminoma bilateral	1
<b>Total</b>	<b>246</b>

Legenda: No caso de tumores mistos, “e” refere que encontravam-se dois tipos de tumor no mesmo testículo e “/” para diferentes testículos.

## 2.2 Idade

A Idade média da população em estudo foi de  $10,69 \pm 2,7$  anos, com a idade mínima de 0,8 anos e máxima de 19 anos (Tabela 2; Gráfico 1). Vinte e cinco % dos animais tinham idade inferior aos 9 anos, e a mediana das idades foi de 11 anos. Os animais diagnosticados com leydigoma tinham uma média de idades de  $10,7 \pm 2,42$  anos (Gráfico 2), com seminoma de  $10,4 \pm 2,82$  (Gráfico 3) e, com sertolinoma de  $9,9 \pm 3,25$  (Gráfico 4). A maioria dos animais ( $n=126$ ; 51,2%) foram diagnosticados com tumor testicular entre os 6 e os 11 anos.

**Tabela 2 – Distribuição das idades dos animais diagnosticados com tumores testiculares.**

<b>Tipo de neoplasia *</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Mediana</b>	<b>Min</b>	<b>Máx</b>
Leydigoma	10,7	2,42	11	7	17
Seminoma	10,4	2,82	10	1	13
Sertolinoma	9,9	3,25	11	0,8	19

\* O mesmo animal pode ser contabilizado nas 3 categorias.

Gráfico 1 – Distribuição da idade dos animais com tumores testiculares por classes.

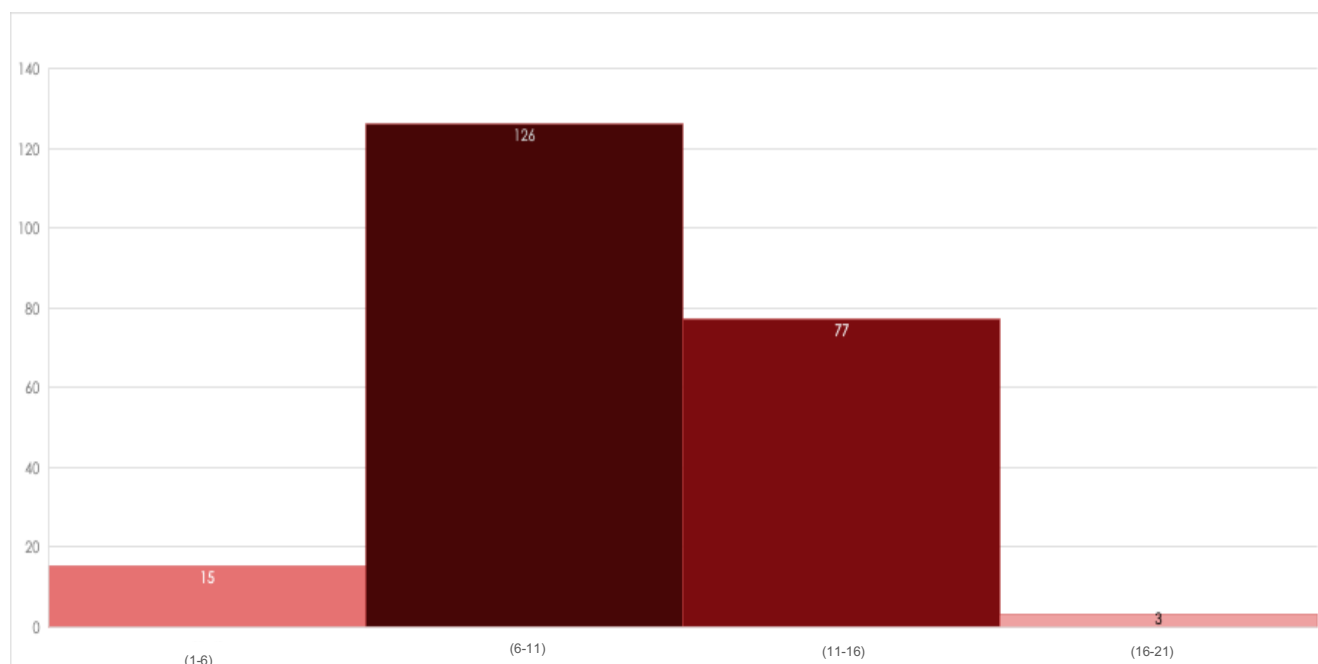


Gráfico 2 - Distribuição da idade dos animais com tumores testiculares do tipo leydigoma por classes.

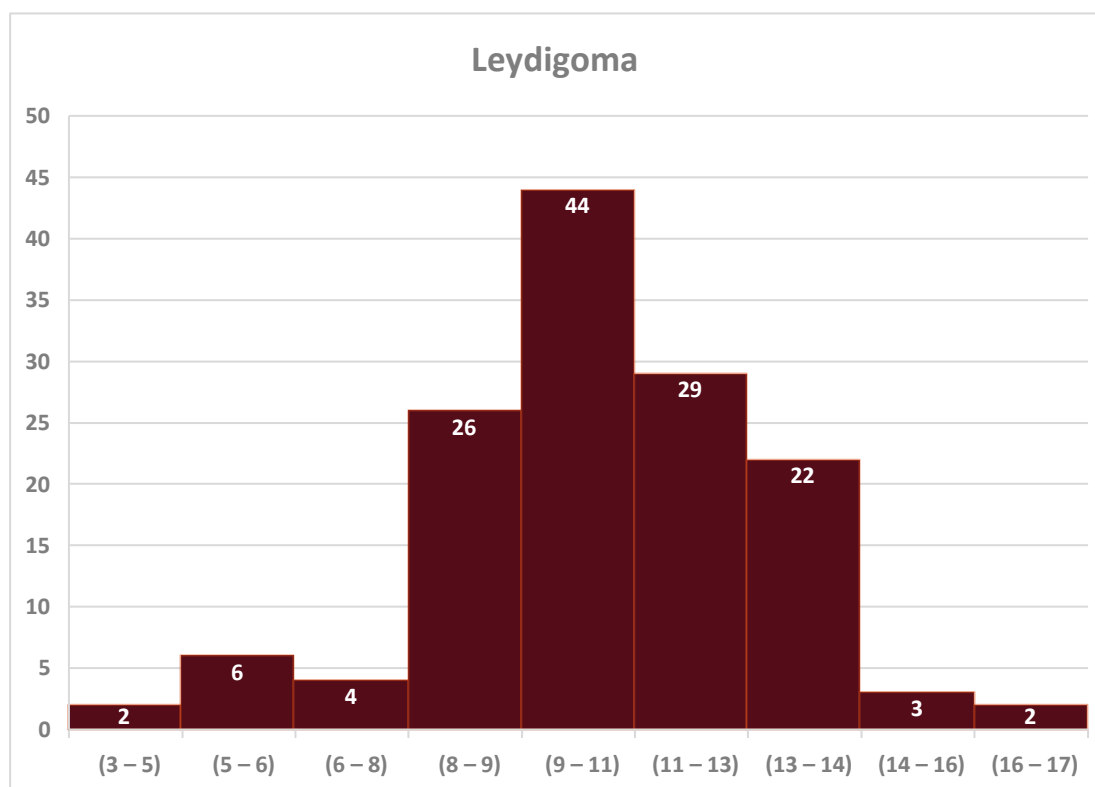


Gráfico 3 - Distribuição da idade dos animais com tumores testiculares do tipo seminoma por classes.

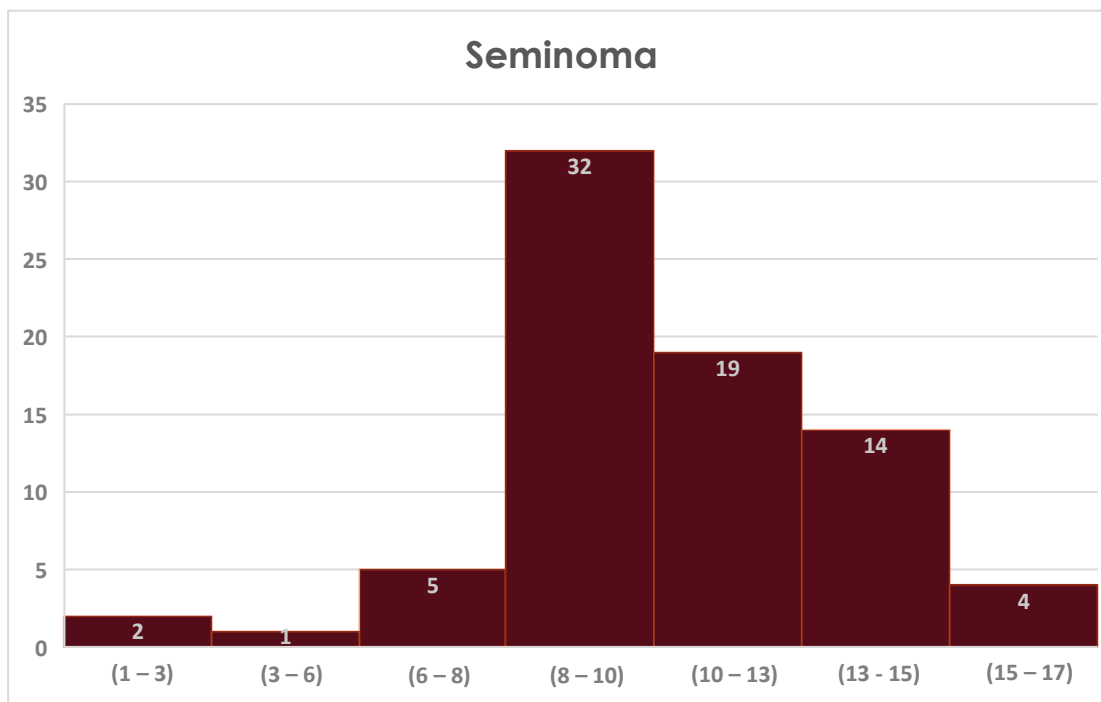
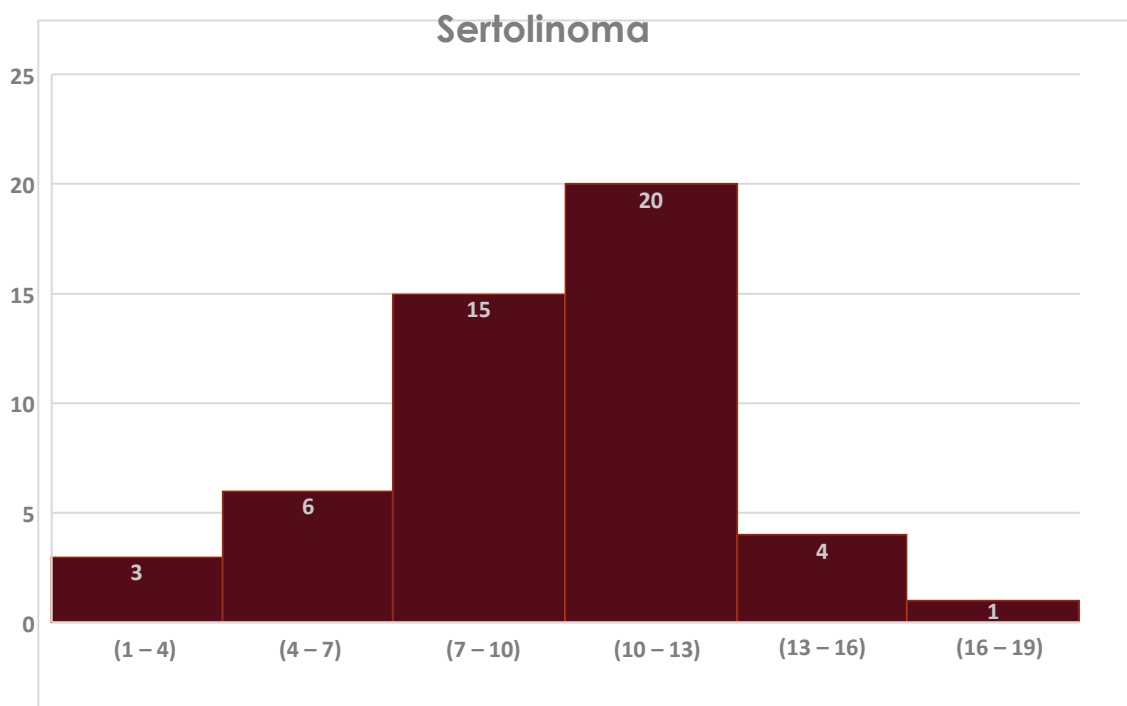


Gráfico 4 - Distribuição da idade dos animais com tumores testiculares do tipo sertolinoma por classes.



## 2.3 Peso

O peso médio dos animais em estudo foi de  $23,20 \pm 12,64$  kg, para os animais com leydigoma de  $23,57 \pm 11,89$  kg, com seminoma de  $23,19 \pm 11,80$ , e com sertolinoma de  $22,87 \pm 15,32$  kg.

## 2.4 Animais Criptorquídicos

Dos cento e cinquenta e nove animais (n=159) com registo no software do HEV, vinte e três (14,5%) eram criptorquídicos, dos quais treze (56,5%) apresentavam o testículo no canal inguinal e oito intra-abdominal (33,3%), não havendo informação da localização dos testículos em dois animais. Em treze (56,5%) dos casos o testículo direito tinha localização ectópica e só num caso (4,3%) o testículo esquerdo estava ectópico. Não foi possível obter informação sobre os restantes casos. Em doze animais (52,2%), o testículo ectópico tinha um seminoma, em nove (39,1%) tinha sertolinoma e em sete (30,4%) leydigoma.

**Tabela 3 – Prevalência de criptorquidismo.**

	Nº de criptorquídeos	Nº de casos totais	Prevalência (%)
<b>Criptorquídeos</b>	23	246	9,3%
Inguinal	13	23	56,5%
Abdominal	8	23	34,8%
Testículo dto	13	23	56,5%
Testículo esq	1	23	4,3%

## 2.5 Tumores das glândulas perianais.

Quarenta e nove (19,9%) animais apresentaram concomitantemente tumores das glândulas perianais. A distribuição destes animais por tipo de tumor testicular está descrita na Tabela 4.

**Tabela 4 – Prevalência de tumores das glândulas perianais associadas ao tipo de tumor.**

Tipo de tumor	Nº de casos	%
<b>Leydigoma</b>	22	44,9%
<b>Seminoma</b>	9	18,4%

<b>Leydigoma e Sertolinoma</b>	6	12,2%
<b>Sertolinoma</b>	5	10,2%
<b>Leydigoma e Seminoma</b>	4	8,2%
<b>Leydigoma, Seminoma e Leydigoma</b>	1	2,0%
<b>Seminoma e Sertolinoma</b>	1	2,0%

## 2.6 Raças mais frequentes

Dos 246 cães machos diagnosticados com tumor testicular, 72 (29,26%) são de raças indeterminadas. Dentro das raças de cães, as mais frequentes foram o Retriever do Labrador com 32 (13,0%) casos e o Golden Retriever com 23 (9,3%). Subdivididos por tipo de tumor, o leydigoma foi diagnosticado em vinte e três (15%) de raça Retriever do Labrador e em treze (8,5%) de raça Golden Retriever (Gráfico 5). O seminoma foi diagnosticado em onze (13,6%) e oito (9,9%) animais das raças Golden Retriever e Retriever do Labrador, respectivamente. O sertolinoma foi diagnosticado em oito animais de raça Retriever do Labrador (14,3%). Para análise da distribuição dos tumores testiculares pelas diferentes raças de cães machos atendidos no HEV-FMV, foram selecionadas raças com mais de 300 registros, cuja análise se apresenta na Tabela 5. A classe com maior número de animais registados pertence à classe SRD (n=12054), com uma proporção de 0,59 animais com diagnóstico de tumor testicular. O Golden Retriever representa a raça com maior proporção de animais com tumores diagnosticados (2,87), seguido do Shih-tzu (2,13), Boxer (1,72), Teckel (1,4) e do Retriever do Labrador (1,16) (Tabela 5). Foi estimada a probabilidade de uma raça ter tumor testicular em comparação com outra (Tabela 6), podendo-se constatar que existe um maior risco estimado na raça Golden Retriever em comparação com o resto das raças, exceto o Shih-tzu e o Teckel. As raças Pinscher e Chihuahua, embora com mais de 300 animais foram retirados desta comparação e estudo por não apresentarem casos de tumor testicular. Dentro dos dados que mais se destacaram encontra-se o Golden Retriever que apresentou um risco estimado para ocorrência de tumor testicular de 10,790 vezes ( $p < 0,05$ ) maior quando comparado com o Jack Russel Terrier, 9,785 vezes ( $p < 0,05$ ) maior relativamente ao Podengo, e 9,608 vezes ( $p < 0,05$ ) maior quando comparado com o risco estimado no Rottweiler. O Boxer também apresentou um risco estimado elevado quando comparado com raças como o Bulldog Francês (10,052,  $p < 0,01$ ), o Caniche (3,257,  $p < 0,05$ ), Pastor Alemão (2,734,  $p < 0,05$ ). O Shih-tzu quando

comparado com o Yorkshire Terrier, apresentou um risco estimado 3,335 maior ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5 – Distribuição do nº de cães machos atendidos no HEV-FMV por raças (n>300) e do nº de tumores testiculares em cada raça.**

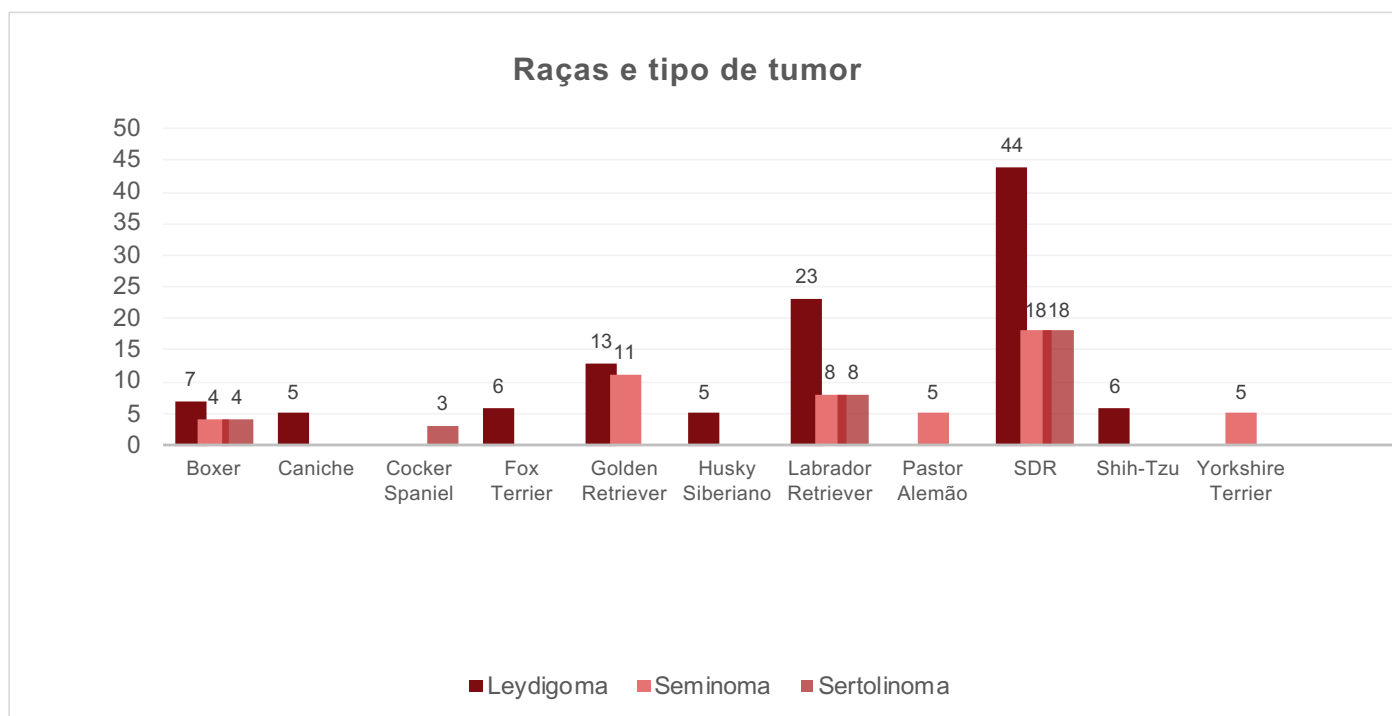
Raça	Nº de animais registrados	Nº de animais com tumor	Proporção
SRD	12054	72	0,59
Retriever do Labrador	2733	32	1,16
Yorkshire Terrier	1389	9	0,64
Pastor Alemão	1250	8	0,64
Bulldog Francês	1149	2	0,17
Caniche	1117	6	0,53
Golden Retriever	778	23	2,87
Boxer	743	13	1,72
Cocker	632	6	0,94
Beagle	468	2	0,43
Pinscher	440	0	0
Jack Russel Terrier	365	1	0
Pitbull	365	2	0,54
Teckel	353	5	1,4
Podengo	331	1	0,3
Rottweiler	325	1	0,53
Shih-Tzu	322	7	2,13
Chihuahua	319	0	0

**Tabela 6 – Probabilidade de um canídeo de uma raça determinada ter tumor testicular em comparação com um canídeo de outra raça (*odd ratio*) relativamente às raças de canídeos machos atendidos no HEV-FMV (n>300).**

	Boxer	Bulldog francês	Caniche	Cocker	Golden retriever	Jack russel terrier	Pastor alemão	Pitbull	Podengo	Retriever do labrador	Rottweiler	SRD	Shih-Tzu	Teckel	Yorkshire terrier
Beagle	0.244	2.455	0.796	0.450	0.145 *	1.560	0.668	0.780	1.415	0.365	1.389	0.715	0.197 **	0.302	0.660
Boxer		10.052 *	3.257 **	1.843	0.592	6.386	2.734 **	3.193	5.791	1.494	5.686	2.929 *	0.805	1.235	2.700 **
Bulldog francês			0.324	0.183 **	0.059 *	0.635	0.272	0.318	0.576	0.149	0.566	0.291	0.080 *	0.123 *	0.269
Caniche				0.566	0.182 *	1.961	0.839	0.980	1.778	0.459	1.746	0.899	0.247 *	0.379	0.829
Cocker					0.321 *	3.465	1.483	1.733	3.142	0.811	3.085	1.589	0.437	0.670	1.465
Golden retriever						10.790 **	4.619 *	5.395 **	9.785 **	2.525 *	9.608 **	4.949 *	1.360	2.087	4.563 *
Jack russel terrier							0.428	0.500	0.907	0.234	0.890	0.459	0.126 **	0.193	0.423
Pastor alemão								1.168	2.118	0.547	2.080	1.071	0.294 **	0.452	0.988
Pitbull									1.814	0.468	1.781	0.917	0.252	0.387	0.846
Podengo										0.258	0.982	0.506	0.139	0.213	0.466
Retriever do labrador											3.805	1.960 *	0.539	0.827	1.807
Rottweiler												0.515	0.142	0.217	0.475
SRD													0.275 *	0.422	0.922
Shih-Tzu														1.535	3.355 **
Teckel															2.186

Legenda: níveis de significância p-value <0,01 (\*) e p-value <0,05 (\*\*)

Gráfico 5 - Raças de cães mais frequentemente diagnosticadas com tumores testiculares e o tipo de tumor.



## 2.7 Tumores malignos

Dois dos animais estudados (0,81%) foram registados com o diagnóstico histopatológico de seminomas malignos.

## 3. DISCUSSÃO.

Os tumores testiculares são os tumores que aparecem com mais frequência no aparelho geniturinário masculino (90%), e são também o segundo tipo de tumor mais comuns em cães depois dos tumores cutâneos (Dhaliwal et al. 1999; Withrow e Vail 2006; Hohšteter et al. 2014). Embora sejam frequentes, normalmente os animais são apresentados à consulta por outro motivo e não por terem complicações devidas ao tumor testicular, pelo que é considerado comumente como um achado clínico (Englar 2019). O estudo da prevalência dos tumores testiculares demonstrou que 0,8% dos animais que foram atendidos no HEV-FMV, no período de sete anos, foram diagnosticados com tumor testicular. No entanto, esta percentagem pode estar a ser subestimada, por um lado devido a não terem sido diagnosticados no exame físico ou a não terem sido submetidos a análise histopatológica.

Tal como descrito em outros estudos (Grieco et al. 2008; Švara et al. 2014), o tipo de tumor mais diagnosticado foi o leydigoma com uma percentagem de 47,6%,

seguido do seminoma com 22% e por último o sertolinoma com 13% dos casos. Interessantemente, o número de tumores mistos no mesmo testículo (15,4%) foi mais baixo do que os 40% encontrados por outros autores (Dhaliwal et al. 1999; Doxsee et al. 2006; Hohšteter et al. 2014). Esta discrepância pode ser devida à população estudada ser diferente.

A idade média dos animais diagnosticados com tumores testiculares foi de 11 anos, o que vai ao encontro do descrito por outros autores (Maiolino et al. 2004; Withrow e Vail 2006; Nødtvedt et al. 2011; Peters et al. 2001). Embora os animais com sertolinoma tivessem uma média de idades de 10 anos, esta encontra-se ligeiramente acima dos 8,6 anos apontados para este tipo de tumor testicular (Dhaliwal et al. 1999; Nødtvedt et al. 2011). A idade mínima de cães machos com diagnóstico de tumor testicular foi de 8 meses, o que muito provavelmente poderá ser uma exceção. Uma vez que esta requisição é referente a um animal externo ao HEV-FMV não foi possível comprovar a idade do animal.

Enquanto aos resultados do peso dos animais relativamente a classe SRD não se pode chegar a uma conclusão por não ter associado informação sobre a condição corporal, apenas pode-se sugerir que sejam animais de raça de médio porte. O estudo de Dobson (2013) sugere que os animais com predisposição para o cancro no geral são animais de raças de grande porte, como o Boxer, Boieiro de Berna e o Golden Retriever.

O criptorquidismo está associado a maior probabilidade de desenvolvimento de tumor testicular, de 5 vezes no sertolinoma e 3 vezes maior no seminoma (Kutzler 2011; Quartuccio et al. 2012). Nestes casos, os testículos são expostos a temperaturas mais elevadas do que fisiologicamente estariam, o que leva a um conjunto de alterações como a proliferação celular (nomeadamente o sertolinoma) e a degenerescência do epitélio germinal (Ciaputa et al. 2012; Cunningham e Kleint, 2009; Kutzler 2011; Withrow e Vail 2006). No nosso estudo a percentagem de animais criptorquídicos pode estar subestimada, por preenchimento incompleto dos registos dos animais no software utilizado no HE-FMV. Por outro lado, o facto de a maioria dos animais criptorquídicos serem orquiectomizados antes dos 4 anos de idade, pode ser responsável pela baixa associação com tumores testiculares. Por esta alteração ser hereditária, é recomendado como boa prática a realização de orquiectomia, já que animais criptorquídeos não devem ser utilizados para a reprodução. Na prática clínica os cães criptorquídeos são diagnosticados em jovens (antes do primeiro ano de idade), pois o encerramento do anel inguinal acontece por volta dos 6-8 meses de idade, e após este tempo já é pouco provável a descida do testículo para o escroto (Quartuccio et al. 2012; Wanke e Gobello 2006).



Curiosamente, o testículo direito esteve associado a mais casos de criptorquidismo. Embriologicamente, este facto pode ser explicado, pois o testículo direito encontra-se mais cranial do que o testículo esquerdo, o que leva a que o testículo direito percorra um caminho mais longo até o escroto (Maiolino et al. 2004).

Embora esteja descrita a associação do sertolinoma com a síndrome de feminização (Quartuccio et al. 2012; Englar 2019), por ausência de informação, não foi possível estabelecermos esta associação no nosso estudo. Em contraste, foi possível em 19,9% dos casos, observar a associação de adenomas das glândulas perianais principalmente com a existência de leydigoma, o que pode ser justificado pelo facto dos adenomas das glândulas perianais serem tumores benignos influenciados pela testosterona (Johnston et al. 1991; Paepe et. al 2016).

O estudo da distribuição das raças atendidas no HEV-FMV permitiu avaliar se as raças com maior número de casos de tumores testiculares diagnosticados eram as que estavam mais representadas no HEV. Esta avaliação tem como limitação a ausência de diagnóstico de tumor testicular em alguns dos cães atendidos no HEV-FMV, não tendo por isso sido registado na base de dados do hospital.

No nosso estudo, quando avaliámos se um animal de uma determinada raça tem maior probabilidade de desenvolver tumor testicular, pudemos observar que os animais das raças Golden Retriever, Boxer e Shih-Tzu tinham uma maior predisposição para o desenvolvimento de tumores testiculares. Os animais SRD foram os que apresentaram maior número de casos diagnosticados com tumor testicular, provavelmente pelo facto de corresponderem ao maior número de animais observados no HEV. Em relação a raças específicas, o Golden Retriever foi a segunda raça com maior proporção de diagnósticos de tumor testicular quando comparada com o número de animais da mesma raça que foram atendidos no HEV-FMV. Esta raça não está descrita na literatura como estando mais predisposta ao desenvolvimento de tumores testiculares. Já no caso da raça Boxer, esta está reconhecida como uma das raças com maior incidência para o desenvolvimento de tumores testiculares, e que possui alta probabilidade para a ocorrência de tumores em geral. Um estudo realizado na Noruega, no qual utilizaram os dados obtidos do Centro de Cancro em animais de companhia, comparando todos as raças com diagnóstico de tumor com as raças com diagnóstico de tumor testicular, indicou que os cães de raça Pastor Alemão e os Collies tinham cinco vezes maior probabilidade de apresentarem tumor testicular. Neste país a castração eletiva não é permitida, é reservada apenas para casos de alterações mórbidas (Nødtvedt et al. 2011). Outras raças descritas como predispostas para o desenvolvimento de tumores testiculares, são o Galgo Afegão, Weimaraner, e Pastor de Shetland, mas os animais

sem raça determinada parecem ter maior predisposição para o desenvolvimento de tumores testiculares (Dhaliwal et al. 1999; Withrow e Vail 2006).

## **VI. AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE VASCULARIZAÇÃO TUMORAL POR DOPPLER E IMUNOFLUORESCÊNCIA.**

### **1. MATERIAL E MÉTODOS**

O protocolo utilizado neste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para a Investigação e Ensino da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (Anexo 1).

#### **1.1 Caracterização da amostra e procedimentos**

Foram utilizados treze cães machos com diagnóstico presuntivo de neoplasia testicular, após exame físico e ecográfico, foram orquiectomizados no serviço de cirurgia do HEV da FMV (Tabela 7). O exame ecográfico pré-cirúrgico, consistiu na avaliação em Modo B do tamanho e ecotextura e ecogenicidade dos testículos e na avaliação do tamanho e do aspeto dos nódulos intra-testiculares. O Esaote MyLab™X7 equipado com uma sonda micro-convexa (3MHz a 11MHz) e uma sonda linear (4 a 16 MHz) foi o equipamento utilizado. Realizamos a avaliação dos testículos foi utilizada a sonda microconvexa numa frequência de 11 MHz em 11 animais e a sonda linear numa frequência de 16 MHz em 2 animais, tendo-se registado 31 sonogramas. Os últimos dois cães foram avaliados com a sonda linear utilizando o Power-Doppler, sendo esta a sonda ideal para avaliação testicular e não ter sido utilizada nos casos anteriores por falta de disponibilidade da mesma. Ao nível testicular, foram registadas as medidas dos testículos e dos nódulos intra-testiculares, assim como também se utilizou o *Doppler Cor* de modo a avaliar a vascularização quer do estroma testicular quer dos nódulos observados, tendo sido estabelecida uma frequência de repetição de pulso de PRF de 1,2 KHz. A avaliação da densidade vascular foi realizada em nove testículos com leydigoma, com cento e trinta e uma medições de área marcada (n=131), cinco testículos com seminoma, com cento e quarenta e três medições (n=143), um testículo com sertolinoma com dez medições (n=10). Também foram avaliados seis testículos normais ou atrofiados (n=6). As imagens ecográficas (n=31) dos quinze testículos com tumor, foram analisadas através do programa ImageJ 1.52q<sup>®</sup>. Após orquiectomia, os testículos (n=21) foram cortados ao nível das lesões e uma das metades foi fixada em formol tamponado (4%) durante 16h e a outra metade foi fixada em paraformaldeído (PFA) a 4% (24-48h). A metade fixada em formol tamponado foi processada no Laboratório de Anatomia Patológica da FMV, para posterior diagnóstico e caracterização do tipo de tumor ou do parênquima normal/atrofiado. A avaliação histopatológica foi efetuada pelo Dr. Hugo Pissarra. As amostras fixadas em PFA foram

desidratadas com soluções crescentes de sacarose, colocadas em gelatina e os blocos obtidos congelados em Isopentano e armazenados a -80°C. Para posterior realização dos ensaios de Imunofluorescência, os blocos foram cortados com uma espessura de 12µm no crióstato e os cortes mantidos a -20 °C (Pedrosa et al. 2018).

**Tabela 7 – Dados recolhidos dos treze (n=13) animais utilizados no estudo.**

Nome	Raça	Idade	Testículo com tumor	Tipo de Tumor	Peso (Kg)	Critproquideo
Nino	Yorkshire terrier	11	Esq	Seminoma	2,9	Sim
Mix	Indeterminada	13	Esq	Seminoma	11,5	Não
Cumle	Jack Russel terrier	12	Dto	Leydigoma	9,5	Sim
Freud	Indeterminada	15	Esq e Dto	Leydigoma - Seminoma	15,7	Não
Zig	Shih-Tzu	7	Esq	Leydigoma	7,6	Não
Furby	Indeterminada	11	Esq	Leydigoma	8,8	Não
Stitch	Shih-Tzu	9	Dto	Seminoma - Sertolinoma	8,45	Sim
Boris	Perdigueiro	10	Dto e Esq	Leydigoma	19,5	Não
Ruffi	Setter Islandes	9	Esq	Seminoma	20,5	Não
Simba	Podengo	14	Esq	Leydigoma	15,5	Não
Zookey	Golden Retriever	11	Dto	Leydigoma	28	Não
Kilby	Dalmata	8	Dto	Leydigomas (bilaterais)	26,2	Não
Tinto	Cão da Serra de Aires	9	Dto	Leydigoma	28,7	Não

## 1.2 Imunofluorescência

Com vista à identificação das células musculares lisas vascular e das células endoteliais dos vasos sanguíneos, procedeu-se à marcação dos vasos por imunofluorescência, utilizando os anticorpos anti-alfa-actina do músculo liso, (anti-aSMA) e o conjunto de antigénios de diferenciação celular das células endoteliais (anti-CD31) (Cherng e Stem 2008; DeLisser et al. 1997). Realizou-se um protocolo de imunofluorescência direta para o anticorpo anti-aSMA descrito na Tabela 8, no qual se utilizou um anticorpo conjugado com um fluorocromo para marcar o antigénio alvo (SMA), e indireta para o anti-CD31, onde foi utilizado um anticorpo secundário conjugado com um fluorocromo (Tabela 9). O protocolo foi adaptado de Pedrosa et al. (2018). Neste trabalho, o anticorpo anti-aSMA foi adicionado após a incubação das lâminas com o anticorpo secundário anti-IgG de murganho para impedir a ligação do anticorpo secundário com o anti-aSMA. Esta alteração foi necessária devido a ambos os anticorpos primários serem produzido em murganho e possível por o anticorpo anti-aSMA ser vendido já conjugado com um fluorocromo, e por isso não precisar de anticorpo secundário para ser visualizado. Foram avaliados tecido testicular sem alteração, atrofiado e com alterações neoplásicas. Também foi realizada coloração com Hematoxilina e Eosina em lâminas gêmeas destas amostras.

A avaliação dos cortes submetidos a imunofluorescência (n=94) foi feita através da observação no microscópio de epifluorescência (Leica DMR<sup>®</sup>) com objetiva de 10x e de 20x, tendo sido obtidas imagens (n=85) na ampliação 20 vezes que foram analisadas através do programa ImageJ 1.52q<sup>®</sup>. Para a avaliação da densidade vascular, foi selecionada uma área constante de medição, onde se realizaram várias capturas nas áreas de interesse e posteriormente foram realizadas médias das diferentes contagens nos tipos de tumor. Esta avaliação, assim como o resto do processamento foi realizado por só um avaliador.

**Tabela 8 – Protocolo de imunofluorescência adaptado Pedrosa et al. (2018).**

<b>1. Descongelação das lâminas 1h/TA</b>
<b>2. Banho maria 15min/37°C</b>
<b>3. 2 x PBS 5min</b>
<b>4. 2 x PBS + 0,1% Tween-20 (PBSW) 10min</b>
<b>5. Blocking solution (5% BSA + 0,3 µ Glicina em PBSW 0,1%) 1h/TA/Câmara húmida</b>
<b>6. <u>Anticorpo 1º (Anti-CD31)</u> em Blocking solution, com lamela, câmara húmida, 4 Cº O/N</b>
<b>7. 5 x PBSW, 10min</b>
<b>8. <u>Anticorpo 2º</u> em Blocking solution, com lamela 1h/TA/Câmara húmida</b>
<b>9. 3 x PBSW 10min*.</b>
<b>10. <u>Anticorpo Anti-SMA</u> em Blocking solution, com lamela 1h/TA/Câmara húmida*</b>
<b>11. 3 x PBSW 5min*</b>
<b>12. 0,15 µg/ml DAPI em PBS 3min*</b>
<b>13. 2 x PBSW 5min*</b>
<b>14. Montar lâminas com Mowiol*</b>

**TA: temperatura ambiente. O/N: Over night. (\*) Escuro.**

**Tabela 9 – Anticorpos utilizados.**

Anticorpo	Hospedeiro	Fornecedor	Uso	Diluição	Tipo de célula marcada	Conjugação
Anti-alpha-Smooth Muscle Actin	Murganho	Sigma	IF	1:200	Células do músculo liso	Cy3
Anti-cluster of differentiation-31 (Monoclonal)	Murganho	Invitrogen	IF	1:50	Células endoteliais	Não conjugado
Anti-IgG H+L de murganho	Burro	Invitrogen	IF	1:200		Alexa 488

### **1.3 Análise estatística**

A unidade experimental utilizada para análise estatística foram os testículos, sendo que vinte e um foram analisados e processados por imunofluorescência, dos quais quinze testículos apresentavam alterações tumorais. Os resultados foram analisados com o programa Microsoft Office Excel<sup>®</sup> (Version 16.38 2020) e o SPSS (Version 26.0.0.0). Foi comprovado a normal distribuição dos dados através do teste Shapiro-Wilk ( $p > 0,05$ ). Foi utilizado o teste ANOVA para comparar os resultados obtidos entre o leydigoma, seminoma e o tecido sem alterações/atrofiado. O nível de significância escolhido foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

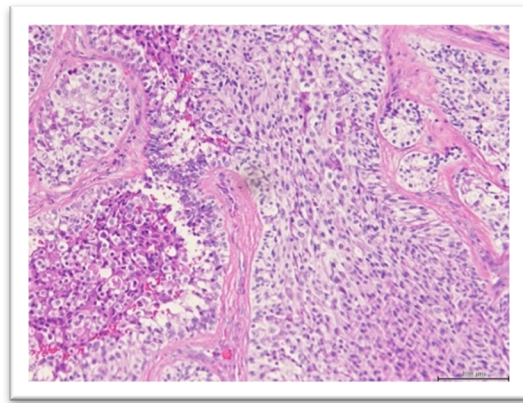
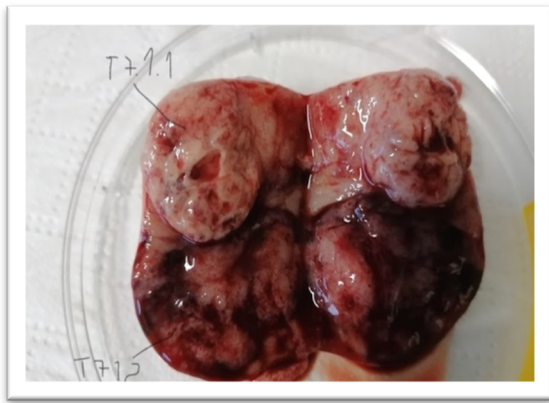
## **RESULTADOS.**

### **2.1 Avaliação macroscópica e histopatológica de tumores testiculares.**

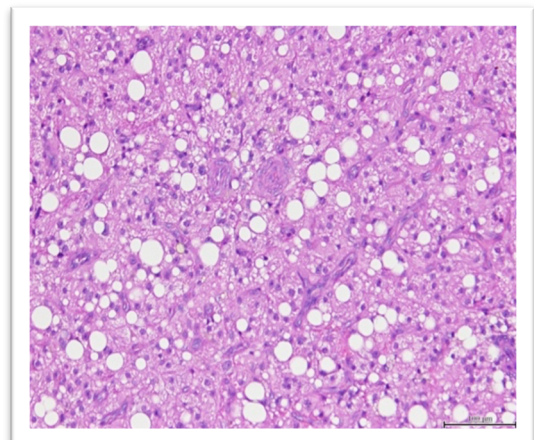
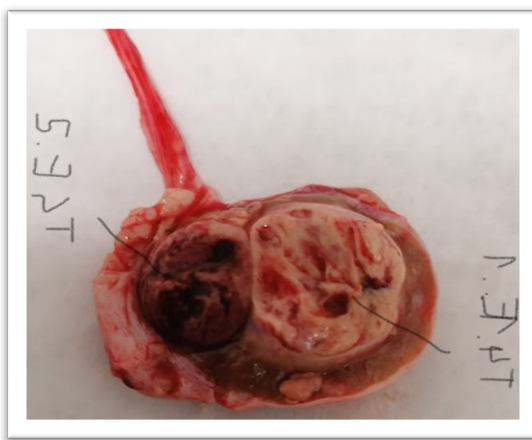
Macroscopicamente, o leydigoma apresentou-se com áreas de aspeto quístico ou sólido, de cor marmoreada e com consistência branda. O seminoma, tem aspeto sólido, homogêneo, de coloração acinzentada e consistência moderadamente firme. O sertolinoma, apresenta uma consistência firme com uma coloração de aspeto nacarado (Figura 5-a).

Em termos histológicos, no caso dos leydigomas, as células neoplásicas encontram-se dispostas de modo contínuo ou rodeando áreas de aspeto quístico. O citoplasma é abundante, finamente granular e eosinofílico, frequentemente vacuolizado, o núcleo é pequeno e de perfil redondo a oval. É um tumor bastante vascularizado, o que resulta frequentemente em hemorragia (Figura 5-a). No caso dos seminomas, as

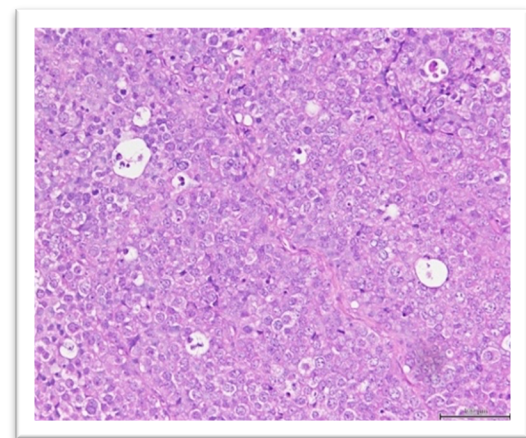
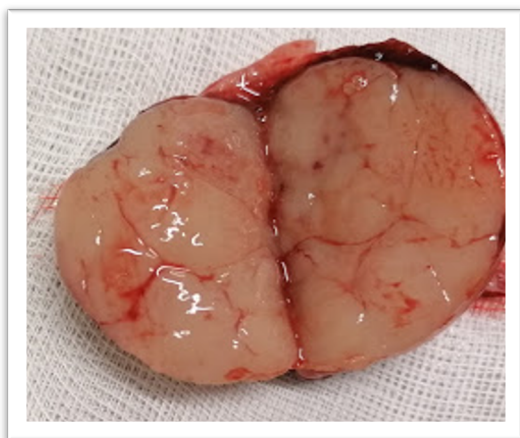
células germinativas neoplásicas, têm um núcleo prominente e hipocromático basofílico, de cromatina pouco condensada e nucléolos evidentes (Figura 5-b). Os sertolinomas, apresentam células alongadas, dispostas em paliçada, perpendicularmente à membrana basal tubular (Figura 5-c).



a. Imagem do aspeto macroscópico e histológico de leydigoma



b. Imagem do aspeto macroscópico e histológico de seminoma



c. Imagem do aspeto macroscópico e histológico de sertolinoma

**Figura 5 – Aspeto macroscópico e histológico de leydigoma (a), seminoma (b) e sertolinoma (c).**



## 2.2 Avaliação da densidade vascular dos tumores por Imunofluorescência e por Doppler cor.

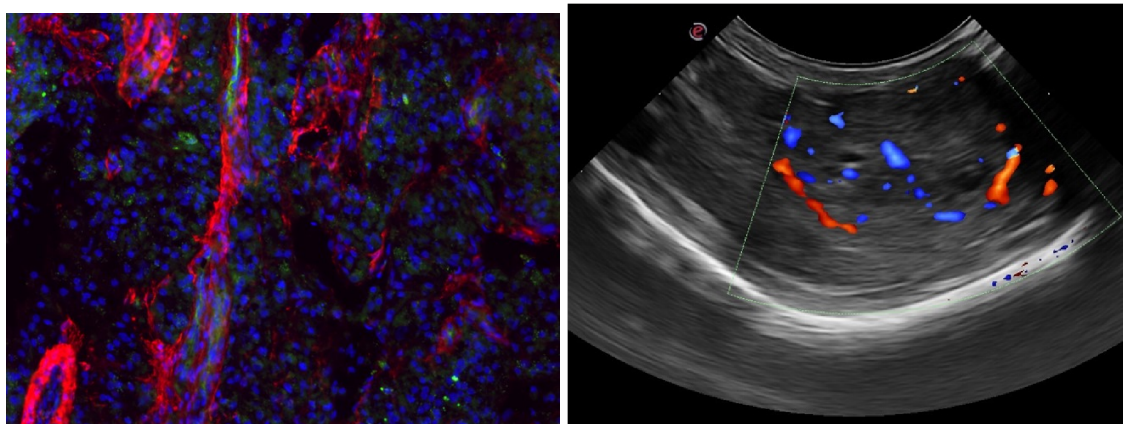
Os resultados da análise da densidade vascular nos diferentes tipos de tumor por imunofluorescência estão descritos nas Tabelas 10 a 14.

### 2.2.1 Leydigoma

Para o leydigoma, a % de área marcada resultou em 7,7% para o Anti-CD31 e em 7,1% para o Anti-SMA (Figura 6).

**Tabela 10 - Valores em percentagem da densidade de marcação vascular nos leydigomas e no testículo normal ou atrofia.**

Normal		Leydigoma	
Anti-CD31	Anti-SMA	Anti-CD31	Anti-SMA
2,8%	4,1%	7,7%	7,1%



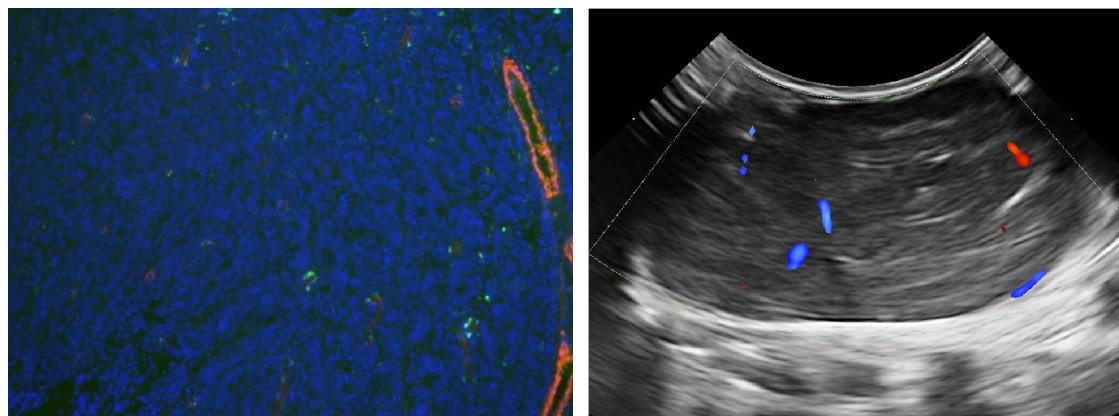
**Figura 6 – Testículo com leydigoma. Exemplo de marcação do padrão de vascularização avaliado por Doppler cor e por imunofluorescência (RGB 20x; Vermelho: Anti-SMA, Verde: Anti-CD31, Azul: Núcleo da célula).**

### 2.2.2 Seminoma

Nos seminomas, a % de área marcada pelo Anti-CD31 foi de 4,4% e para o Anti-SMA de 4,0% (Figura 7).

**Tabela 11 - Valores em percentagem da densidade de marcação vascular nos seminomas e no testículo normal ou atrofia.**

Normal		Seminoma	
Anti-CD31	Anti-SMA	Anti-CD31	Anti-SMA
2,8%	4,1%	4,4%	4,0%



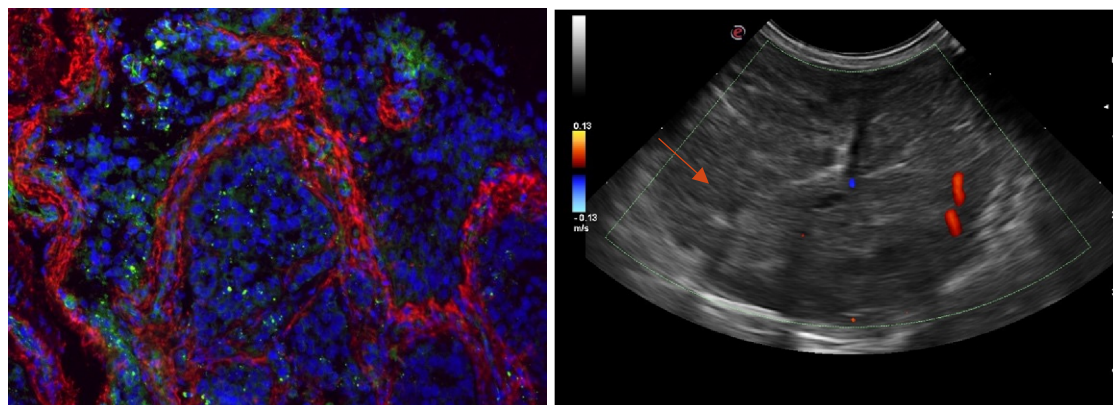
**Figura 7 – Testículo com seminoma. Exemplo de marcação do padrão de vascularização avaliado por Doppler cor e por imunofluorescência (RGB 20x; Vermelho: Anti-SMA, Verde: Anti-CD31, Azul: Núcleo da célula).**

### 2.2.3 Sertolinoma

Nos sertolinomas, os valores de área marcada em % resultaram em 5,0% para o Anti-CD31 e em 9,2% o Anti-SMA (Figura 8).

**Tabela 12 - Valores em percentagem da densidade de marcação vascular nos sertolinomas e no testículo normal ou atrofia.**

Normal		Sertolinoma	
Anti-CD31	Anti-SMA	Anti-CD31	Anti-SMA
2,8%	4,1%	5,0%	9,2%

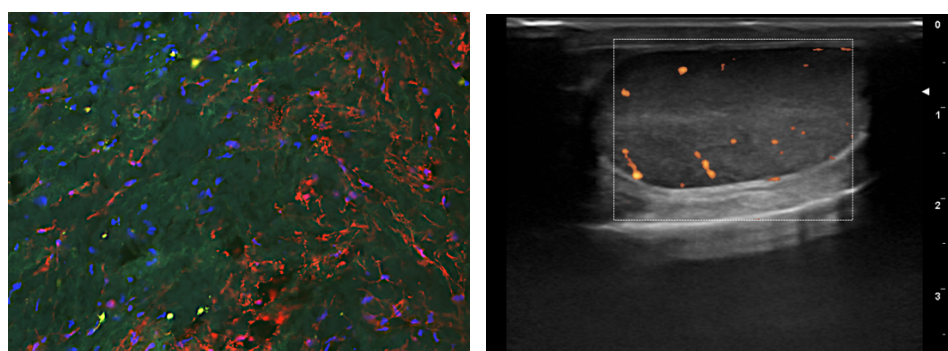


**Figura 8 – Testículo com sertolinoma. Exemplo de marcação do padrão de vascularização avaliado por Doppler cor e por imunofluorescência (RGB 20x; Vermelho: Anti-SMA, Verde: Anti-CD31, Azul: Núcleo da célula).**

Quando comparamos as % de área marcada entre o leydigoma, o seminoma e o tecido testicular/atrofiado, verificamos que o primeiro apresenta uma maior área de marcação quer para o Anti-CD31 ( $p < 0,01$ ) quer para o Anti-SMA ( $p < 0,01$ ) (Tabela 13).

**Tabela 13 - Valores em percentagem da análise de leydigoma e seminoma e a análise de parênquima normal/atrofia.**

Normal		Leydigoma		Seminoma	
Anti-CD31	Anti-SMA	Anti-CD31	Anti-SMA	Anti-CD31	Anti-SMA
2,8%	4,1%	7,7%	7,1%	4,4%	4,0%



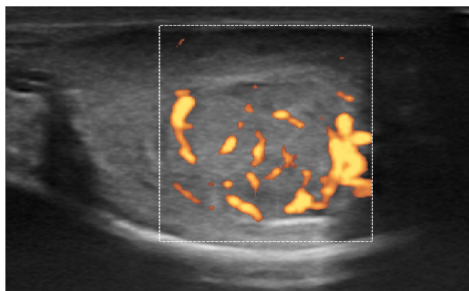
**Figura 9 – Testículo normal. Exemplo de marcação do padrão de vascularização avaliado por Power-Doppler e por imunofluorescência (RGB 20x; Vermelho: Anti-SMA, Verde: Anti-CD31, Azul: Núcleo da célula).**

Por último, o resultado da avaliação das imagens ecográficas com sonda microconvexa, representada em valores de percentagens referentes à área de marcação na tabela 14, com valores de 2,6% para o leydigoma, 1,3% para o seminoma, e 0,9% para o sertolinoma. Nos dois casos avaliados com a sonda linear, ambos leydigomas, a área de marcação identificada correspondeu a 12,3% (Figura 10), estas duas avaliações não entraram na média representada na tabela 14. Os volumes dos tumores testiculares obtidos na avaliação ecográfica estão descritos na tabela 15. A fórmula utilizada para o cálculo do volume do tumor testicular foi  $V=C*L*L/2$  (C=comprimento; L=largura), adaptado de Monga et. al (2000).

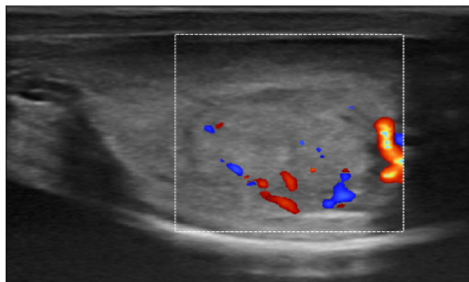
**Tabela 14 - Comparação da percentagem de áreas vasculares identificadas por Doppler cor os diferentes tipos de tumores.**

Leydigoma (n=7)	Seminoma (n=5)	Sertolinoma (n=1)
3,6%	1,3%	1,2%

a)



b)



**Figura 10 – Testículo Leydigoma. Exemplos de sonogramas obtidos com sonda linear num caso de leydigoma (a) Power Doppler, (b) Doppler cor.**

**Tabela 15 - Volume (mm3) dos tumores testiculares medidos ecograficamente.**

Leydigoma	Seminoma	Raça	Idade
	8,06	Yorkshire terrier	11
		Indeterminada	13
1,69		Jack Russel terrier	12
6,49	1,90	Indeterminada	15
0,80		Shih-Tzu	7
1,25		Indeterminada	11
	2,97	Shih-Tzu	9
5,38		Perdigueiro	10
	0,70	Setter Islandes	9
		Podengo	14
3,47		Golden Retriever	11
1,81		Dalmata	8
		Cão da Serra de Aires	9
<b>2,98</b>	<b>3,41</b>		

### 3. DISCUSSÃO.

Ao exame físico, as alterações observadas ao nível testicular podem sugerir a presença de possíveis tumores (Withrow e Vail 2006; De Gier et al. 2009). Deste modo, o aumento de tamanho, a consistência firme, a presença de nódulos e aderências deverá levar o médico veterinário a solicitar um exame ecográfico para melhor avaliar a situação. A apresentação dos tumores na avaliação ecográfica é muito variável, podendo ser observadas lesões focais ou multifocais, que se apresentam desde pequenos nódulos circunscritos a grandes massas complexas, com alteração da anatomia normal do testículo (Johnston et al. 1991; Salomão e Domingos 2011).

Os leydigomas apresentam muitas vezes aspeto hemorrágico, devido ao facto de serem bastante vascularizados e por terem frequentemente cavidades quísticas repletas de sangue. Os seminomas tinham um aspeto sólido, homogéneo, de coloração acinzentada e consistência moderadamente firme. Dos três, os sertolinomas apresentaram-se com a consistência mais firme, o que está de acordo com a descrição por outros autores (Englar 2019; Meuten 2016).

As neoplasias testiculares são o resultado do crescimento anormal de diferentes identidades celulares, sendo que a progressão e crescimento estão associadas ao processo de formação de novos vasos (angiogénese) para conseguir suprir as exigentes necessidades dos tumores (King 1996; Lodish et al. 2001). Sabe-se que, no geral, nos tumores existe uma neoangiogénese aberrante, o que, em parte, é devido a produção elevada de VEGF, quando comparada com a angiogénese normal, durante a cicatrização de feridas, por exemplo (Iso et al. 2003; Russo et al. 2012).

Nesse sentido, o objetivo de este estudo foi caracterizar a vasculatura tumoral dos três tipos de tumores testiculares mais frequentemente encontrados nos cães por técnicas ecográficas e histopatológicas. Nenhum padrão vascular discriminativo foi detetado à ecografia utilizando Doppler cor, embora há autores que descrevem que os leydigomas na avaliação ecográfica estão associados a uma hipervascularização intrínseca (Maxwell et al. 2016). No entanto, na avaliação por imunofluorescência, a densidade vascular está aumentada nos leydigomas em comparação com os seminomas e o tecido testicular sem alterações neoplásicas. Como só obtivemos uma amostra de sertolinoma, não se conseguiu fazer a análise comparativa em relação a este tipo de tumor. A maior vascularização nos leydigomas poderá estar associada a uma maior expressão de EG-VEGF. Samson et al. (2004) e Jennewein et al. (2018) observaram que a expressão deste fator de crescimento vascular encontra-se aumentada nos leydigomas em relação aos seminomas e sertolinomas.

Não foi possível fazer uma comparação estaticamente significativa da análise de densidade vascular pelo método de imunofluorescência com os resultados da avaliação ecográfica, pois este estudo teve a limitação da sonda ideal para avaliação testicular, a sonda linear, só estar disponível nos últimos dois casos. A utilização da sonda microconvexa subavaliou a densidade vascular, não permitindo obter diferenças entre os tumores. No entanto, os dados de dois pacientes obtidos com a avaliação por sonda linear, já parecem ajustar-se mais aos resultados obtidos pela imunofluorescência. Sendo que apenas dois pacientes foram avaliados por sonda linear, não foi possível retirar conclusões significativas, mas a tendência observada sugere que este estudo deveria ser prolongado com recurso sistemático a esta sonda.

Os resultados obtidos apontam para uma maior densidade vascular no leydigoma. Uma vez que a angiogénese permite suprir as necessidades nutricionais e respiratórias, o que é essencial para o crescimento tumoral, o aumento da densidade vascular deveria ser traduzido por uma maior proliferação celular, assim como um aumento na capacidade de crescimento. No entanto, a média do volume médio dos leydigomas não foi maior que o dos seminomas. Este facto pode estar relacionado com o número reduzido de casos estudados e destes englobarem raças de diferente tamanho. Por outro lado, no único caso em que ambos os tumores estavam presentes, o leydigoma apresentou um volume maior que o seminoma.

Apesar do aumento da densidade vascular tumoral ser frequentemente correlacionado com uma maior probabilidade de metastização, não foi descrito nenhum caso neste estudo. Neste contexto, poder-se-ia pensar que o leydigoma fosse um tipo de tumor com alta capacidade de metastização, mas está descrito pela literatura como benigno, em contraste com os seminomas e sertolinomas, que podem desenvolver metástases em 15% dos casos (Withrow e Vail 2006). Interessantemente, o leydigoma é caracterizado por um forte padrão de marcação de E-caderina. A E-caderina é uma proteína transmembranar associada a adesão celular, sendo que a fraca expressão desta proteína está associada a um elevado potencial metastático (Ciaputa et al. 2014). O leydigoma, como os outros tumores testiculares, aparecem, em média, em animais geriátricos (>10 anos), sendo a orquiectomia o tratamento de eleição. No entanto, no caso de presuntivamente ser identificado este tipo de tumor testicular pelo exame ecográfico, poderia considerar-se não optar pela cirurgia e não submeter o cão ao risco anestésico que esta implica.

## **VII. CONCLUSÕES.**

Dos resultados obtidos no estudo retrospectivo destacam-se a maior prevalência do leydigoma, assim como se confirma o aumento da ocorrência de tumores testiculares em animais idosos, pelo que a palpação testicular deverá ser feita sistematicamente em todos os cães machos, em especial aqueles com mais de 10 anos. Embora descritos pela literatura como muito frequentes, os tumores testiculares não parecem apresentar alterações metastáticas nos animais, já que raramente metastizam. No entanto, os tumores testiculares podem estar associados a problemas secundários à excessiva produção hormonal. É o caso dos sertolinomas que estão frequentemente associados a alterações como o síndrome de feminização. No nosso estudo a raça Golden Retriever demonstrou ter uma predisposição significativa para a ocorrência de tumores testiculares quando comparado com outras raças.

Em termos ecográficos não foi possível caracterizar nenhum padrão vascular associado a cada tipo de tumor. No entanto, por imunofluorescência, foi possível verificar que os leydigomas apresentam uma densidade vascular elevada em comparação com os outros tipos de tumores. Para melhores resultados na avaliação da área vascular por ecografia dos tumores testiculares, esta deve ser realizada com uma sonda linear. O método de imunofluorescência demonstrou ser importante para a avaliação da densidade vascular no testículo normal e nos tumores testiculares.



## VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K & Watson JD. 1994. The Molecular Biology of the Cell. Garland, New York, 3rd Ed.
2. Anand RJK, Paust H-J, Altenpohl K, Mukhopadhyay AK. 2003. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Production by Leydig Cells In Vitro: The Role of Protein Kinase A and Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade. *Biology of Reproduction*. 68(5):1663–1673. doi:10.1095/biolreprod.102.009795.
3. Bergers G. & Benjamin LE. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews. Cancer*, 3, 401–10.
4. Bigliardi E, Denti L, Cesaris V de, Bertocchi M, Parmigiani E, Bresciani C, Maria A. 2019. Colour Doppler ultrasound imaging of blood flows variations in neoplastic and non - neoplastic testicular lesions in dogs. (April 2018):63–71. doi:10.1111/rda.13310.
5. Borre M, Offersen B v., Nerstrom B, Overgaard J. 1998. Microvessel density predicts survival in prostate cancer patients subjected to watchful waiting. *British Journal of Cancer*. 78(7):940–944. doi:10.1038/bjc.1998.605.
6. Ciaputa R, Nowak M, Kielbowicz M, Antończyk A, Błasiak K, Madej JA. 2012. Seminoma, sertolioma, and leydigoma in dogs: Clinical and morphological correlations. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 56(3):361–367. doi:10.2478/v10213-0120063-8.
7. Ciaputa R, Nowak M, Madej JA, Poradowski D, Janus I, Dziegiel P, Gorzyska E, Kandefer-Gola M. 2014. Inhibin- $\alpha$ , E-cadherin, calretinin and Ki-67 antigen in the immunohistochemical evaluation of canine and human testicular neoplasms. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 52(4):326–334. doi:10.5603/FHC.a2014.0036.
8. Cummings OW, Ulbright TM, Eble JN, Roth LM. 1994. Spermatocytic seminoma: An immunohistochemical study. *Human Pathology*. 25(1):54–59. doi:10.1016/00468177(94)90171-6.
9. Cunningham, J.G., Klein, B.G. 2009. *Fisiologia Veterinária*. 4<sup>a</sup> edition, cap. 35, pp. 518–523. Espanha: Elsevier Saunders.
10. Coussens LM & Werb Z. 2001. Inflammatory cells and cancer: think different! *The Journal of experimental medicine*, 193, F23–6.
11. De Gier J, Van Sluijs FJ. 2009. Male reproductive tract. In: Rijnberk A, Sluijs FJv, editors. *Medical history and physical examination in companion animals*. 2nd ed. Edinburgh; New York: Saunders/Elsevier; p.117–22.
12. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, et al. 1997. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *American Journal of Pathology*. 151(3):671– 677.
13. Dhaliwal RS, Kitchell BE, Knight BL. 1999. Treatment of aggressive testicular tumors in four dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 35(4):311–318. doi:10.5326/15473317-35-4-311.
14. Dobson JM. 2013. Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. *ISRN Veterinary Science*. 2013(August):1–23. doi:10.1155/2013/941275.
15. Doxsee AL, Yager JA, Best SJ, Foster RA. 2006. Extratesticular interstitial and Sertoli cell tumors in previously neutered dogs and cats: A report of 17 cases. *Canadian Veterinary Journal*. 47(8):763–766.
16. Dreimanis U, Vargmar K, Falk T, Cigut M, Toresson L. 2012. Evaluation of preputial cytology in diagnosing oestrogen producing testicular tumours in dogs. *Journal of Small Animal Practice*. 53(9):536–541. doi:10.1111/j.1748-5827.2012.01261.x.
17. Dogra VS, Rubens DJ, Gottlieb RH, Bhatt S. 2004. Torsion and beyond. *J Ultrasound Med*, v.23, p.1077–1085.
18. Englar Ryane, John Wiley & Sons, Inc. 2019. Abnormalities Associated with Testicular Palpation. In: *Common Clinical Presentations in Dogs and Cats*. Vol. 717–728.
19. Grieco V, Riccardi E, Greppi GF, Teruzzi F, Iermanò V, Finazzi M. 2008. Canine Testicular Tumours: a Study on 232 Dogs. *Journal of Comparative Pathology*. 138(2–3):86– 89. doi:10.1016/j.jcpa.2007.11.002.
20. Hanahan D & Folkman J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86, 353–64.



21. Hayes HM, Pendergrass TW. 1976. Canine testicular tumors: Epidemiologic features of 410 dogs. *International Journal of Cancer*. 18(4):482–487. doi:10.1002/ijc.2910180413.
22. HogenEsch H, Whiteley HE, Vicini DS, Helper LC. 1987. Seminoma with metastases in the eyes and the brain in a dog. *Veterinary pathology*. 24(3):278–280. doi:10.1177/030098588702400315.
23. Hohšteter M, Artuković B, Severin K, Kurilj AG, Beck A, Šoštarić-Zuckermann IC, Grabarević Z. 2014. Canine testicular tumors: Two types of seminomas can be differentiated by immunohistochemistry. *BMC Veterinary Research*. 10(1):1–9. doi:10.1186/s12917014-0169-8.
24. Huang DY, Sidhu PS. 2012. Focal testicular lesions: Colour Doppler ultrasound, contrastenhanced ultrasound and tissue elastography as adjuvants to the diagnosis. *British Journal of Radiology*. 85 (SPEC. ISSUE 1):41–53. doi:10.1259/bjr/30029741.
25. Hyman SE. 1993. Molecular and cell biology of addiction.
26. Houlihan. 2017. A literature review on the welfare implications of gonadectomy of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 250(10):1155–1166. doi:10.2460/javma.250.10.1155.
27. Iso T, Hamamori Y, Kedes L. 2003. Notch signaling in vascular development. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 23(4):543–553. doi:10.1161/01.ATV.0000060892.81529.8F.
28. clerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 23(4):543–553.
29. Jennewein L, Bartsch G, Gust K, Kvasnicka HM, Haferkamp A, Blaheta R, Mittelbronn M, Harter PN, Mani J. 2018. Increased tumor vascularization is associated with the amount of immune competent PD-1 positive cells in testicular germ cell tumors. *Oncology Letters*. 15(6):9852–9860. doi:10.3892/ol.2018.8597.
30. Johnston S, Root M, Olson P. (2001). *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia: Saunders. Chapter 18. p324.
31. Joshi S, Yu D. 2017. Immunofluorescence. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B9780-12-803077-6.00008-4>.
32. Kamat M, Shetye S, Singh NP, Nattey K, Barman S. 2019. Testicular mixed germ cell tumour with isolated skip metastasis to unilateral pleura: First case reported in the literature. *International Journal of Surgery Case Reports*. 63:108–112. doi:10.1016/j.ijscr.2019.08.029. <https://doi.org/10.1016/j.ijscr.2019.08.029>.
33. Karar J, Maity A. 2011. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 4(December):1–8. doi:10.3389/fnmol.2011.00051.
34. Kennedy PC, Cullen JM, Edwards JF, Goldschmidt MH, Larsen S, Munson L, Nielsen S. 1998. Histological classification of Tumor of the Genital System of Domestic Animals. Second Series, Volume IV. World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology. Washington D.C.
35. Kim JH, Yu CH, Yhee JY, Im KS, Kim NH, Sur JH. 2010. Canine classical seminoma: A specific malignant type with human classifications is highly correlated with tumor angiogenesis. *BMC Cancer*. 10. doi:10.1186/1471-2407-10-243.
36. King, RJB. 1996. *Cancer Biology*. Longman, Essex.
37. Kumar V, Talekar SH, Vadalía J v, Fefar DT. 2018. Malignant seminoma with pulmonary and bony metastases in a crossbred Spitz dog. *Indian Journal of Veterinary Surgery*. 39(1):57–58.
38. Kutzler MA. The Reproductive Tract. In: Peterson ME, Kutzler MA, editors. *Small animal pediatrics : the first 12 months of life*. St. Louis, Mo.: Saunders/Elsevier; 2011. p. 40517.
39. Lawrence JA, Saba CF. Tumors of the Male Reproductive System. In: Withrow SJ, Vail DM, Page RL, editors. *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology*. 5th edition / ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2013. p. 557-71.
40. Lin CC, Huang WJS, Chen KK. 2009. Measurement of testicular volume in smaller testes: How accurate is the conventional orchidometer? *Journal of Andrology*. 30(6):685– 689. doi:10.2164/jandrol.108.006460.
41. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D & Darnell J. 2001. *Molecular Cell Biology*. Freeman, 4th Edition.

42. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. 2020. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 77(9):1745–1770. doi:10.1007/s00018-019-03351-7. <https://doi.org/10.1007/s00018019-03351-7>.
43. Marshall H. 2018. Estrogen-induced myelotoxicity in a 4-year-old golden retriever dog due to a Sertoli cell tumor. *the Canadian Veterinary Medical Association*. Apr;59(4):425427.
44. Maiolino P, Restucci B, Papparella S, Paciello O, de Vico G. 2004. Correlation of nuclear morphometric features with animal and human world health organization international histological classifications of canine spontaneous seminomas. *Veterinary Pathology*. 41(6):608–611. doi:10.1354/vp.41-6-608.
45. Maxwell F, Izzard V, Ferlicot S, Rachas A, Correias JM, Benoit G, Bellin MF, Rocher L. 2016. Colour Doppler and ultrasound characteristics of testicular Leydig cell tumours. *British Journal of Radiology*. 89(1062). doi:10.1259/bjr.20160089.
46. Monga SP, Wadleigh R, Sharma A, et al. Intratumoral therapy of cisplatin/epinephrine injectable gel for palliation in patients with obstructive esophageal cancer. *Am J Clin Oncol*. 2000;23(4):386–392.
47. Meuten DJ. 2016. Tumors in Domestic Animals, Fifth edition. Chapter 16. p708.
48. Nelson R & Couto C. 2015. Medicina Interna de Pequenos Animais. 5th Edition.
49. Nicholson BD, Jones NR, Protheroe A, Joseph J, Roberts NW, van den Bruel A, Fanshawe TR. 2019. The diagnostic performance of current tumour markers in surveillance for recurrent testicular cancer: A diagnostic test accuracy systematic review. *Cancer Epidemiology*. 59(January):15–21. doi:10.1016/j.canep.2019.01.001. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2019.01.001>.
50. Noakes D, Parkinson T & England G. 2019. Veterinary Reproduction and Obstetrics. Tenth edition Chapter 36. p656.
51. Nødtvedt A, Gamlem H, Gunnes G, Grotmol T, Indrebø A, Moe L. 2011. Breed differences in the proportional morbidity of testicular tumours and distribution of histopathologic types in a population-based canine cancer registry. *Veterinary and Comparative Oncology*. 9(1):45–54. doi:10.1111/j.1476-5829.2010.00231.x.
52. Paepe D, Hebbelinck L, Kitshoff A, Vandenabeele S. Feminization and severe pancytopenia caused by testicular neoplasia in a cryptorchid dog. *Vlaams Diergen Tijds*. 2016;85(4):197-205.
53. Pedrosa AR, Trindade A, Duarte A. 2018. Methods to study angiogenesis in a mouse model of prostate cancer. *Methods in Molecular Biology*. 1786:29–54. doi:10.1007/9781-4939-7845-8\_2.
54. Pelengaris S, Khan M & Evan G. 2002. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nature reviews. Cancer*, 2, 764-76.
55. Peters MA, de Rooij DG, Teerds KJ, van de Gaag I, van Sluijs FJ. 2001. Spermatogenesis and testicular tumours in ageing dogs. *J Reprod Fertil Suppl* 57, 419-421.
56. Plank MJ & Sleeman BD. 2003. Tumour-Induced Angiogenesis: A Review. *Journal of Theoretical Medicine*, 5, 137-153.
57. Quartuccio M, Marino G, Garufi G, Cristarella S, Zanghi A. 2012. Sertoli cell tumors associated with feminizing syndrome and spermatic cord torsion in two cryptorchid dogs. *Journal of Veterinary Science*. 13(2):207–209. doi:10.4142/jvs.2012.13.2.207.
58. Restucci B, Maiolino P, Paciello O, Martano M, De Vico G, Papparella S. Evaluation of angiogenesis in canine seminomas by quantitative immunohistochemistry. *J Comp Pathol*. 2003;128(4):252-9.
60. Ruddon RW. 2007. Cancer Biology. Oxford University Press, 4th Edition.
61. Russo G, Mischi M, Scheepens W, de La Rosette JJ, Wijkstra H. 2012. Angiogenesis in prostate cancer: Onset, progression and imaging. *BJU International*. 110(11 C):794– 808. doi:10.1111/j.1464-410X.2012.11444.x.
62. Roy B, Lewis CE, Ferrara N & (Eds). 1997. Tumor Angiogenesis. Oxford University Press.
63. Salomão M, Domingos TCS. 2011. Meios de diagnóstico das principais afecções testiculares em cães: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 35(4):393–399.

64. Samson M, Peale F v., Frantz G, Rioux-Leclercq N, Rajpert-De Meyts E, Ferrara N. 2004. Human endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: Expression early in development and in Leydig cell tumors suggests roles in normal and pathological testis angiogenesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 89(8):4078– 4088. doi:10.1210/jc.2003-032024.
65. Souza MB, Mota Filho AC, Sousa CVS, Monteiro CLB, Carvalho GG, Pinto JN, Linhares JCS, Silva LDM. 2014. Triplex doppler evaluation of the testes in dogs of different sizes. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 34(11):1135–1140. doi:10.1590/S0100736X2014001100017.
66. Švara T, Gombac M, Pogorevc E, Plavec T, Zrimšek P, Pogacnik M. 2014. A retrospective study of canine testicular tumours in Slovenia. *Slovenian Veterinary Research*. 51(2):81–88. doi:10.13140/2.1.1966.9123.
67. Thorvaldsen TE, Nødtvedt A, Grotmol T, Gunnes G. 2012. Morphological and immunohistochemical characterisation of seminomas in Norwegian dogs. *Acta veterinaria Scandinavica*. 54(September):52. doi:10.1186/1751-0147-54-52.
68. Togni A, Rütten M, Rohrer Bley C, Hurter K. 2015. Metastasized Leydig cell tumor in a dog. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*. 157(2):111–116. doi:10.17236/sat00010.
69. Vital RJ, de Mattos LA, de Souza LRMF, Figueirêdo SDS, Szejnfeld J. 2007. Sonographic findings in non-neoplastic testicular lesions. *Radiologia Brasileira*. 40(1):61–67. doi:10.1590/S0100-39842007000100013.
70. Wanke MM, Gobello C. 2006. Reproducción en caninos y felinos domésticos. Buenos Aires: Intermedica, 2006. p.129-135.
71. Withrow, Stephen & Vail DM. 2006. *Small Animal Clinical Oncology* 4th Edition. 4th ed. David Vail, editor. St. Louis, Missouri: Copyright © 2007 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.
72. Wrigley RDennisRMKirbergerFBarrRH. 2010. *Handbook of Small Animal Radiology and Ultrasound, Techniques and Differential Diagnoses*, 2nd Ediotion (Vetbooks.ir).
73. Yates D, Hayes G, Heffernan M, Beynon R. 2003. Incidence of cryptorchidism in dogs and cats. *Vet Rec*. 152(16):502-4.
74. Zachary J & McGavin M. 2011. *Pathologic Basis of Veterinary Disease* 5th Edition. Elsevier, editor.
75. Zuazo-Gaztelu I, Casanovas O. 2018. Unraveling the role of angiogenesis in cancer ecosystems. *Frontiers in Oncology*. 8(JUL):1–13. doi:10.3389/fonc.2018.00248.

## IX. ANEXOS.

### Anexo 1 - Comissão de Ética para a Investigação e Ensino da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa



FACULDADE DE  
MEDICINA VETERINÁRIA  
*Comissão de Ética para a  
Investigação e Ensino (CEIE)*



Exma. Senhora  
Professora Doutora Luisa Mateus  
Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa, 28 de fevereiro 2020

Assunto: Avaliação projeto de investigação – N/Ref<sup>a</sup> 009/2020

Vimos pela presente informar V.Exa. que a CEIE, após ter avaliado as atividades que envolvem manipulação de animais, no âmbito do projeto de investigação "Ultrasonographic and Histological Characterization of Canine Testicular Tumours" considerou que estão salvaguardados os princípios éticos e de bem-estar animal exigidos pela legislação vigente e pelo código de boas práticas, pelo que aprovou a execução do protocolo experimental nas instalações e serviços da FMV, conforme requerido por V.Exa.

Com os melhores cumprimentos,

Luis Telo da Gama  
Presidente da Comissão de Ética para a Investigação e Ensino

**Anexo 2 – Raças de cães machos diagnosticados com tumor testicular e o tipo de tumores.**

<b>Raças</b>	<b>Leydigoma</b>	<b>Seminoma</b>	<b>Sertolinoma</b>
SRD	44	18	18
Retriever do Labrador	20	8	7
Golden Retriever	13	11	2
Boxer	7	4	4
Fox terreir	6	2	1
Shih-tzu	6	1	1
Husky siberiano	5	3	0
Caniche	5	1	1
Yorkshire Terrier	3	5	1
Pastor Alemão	3	4	2
American Stanfordshire terrier	2	2	1
Teckel	2	2	1
Dalmata	2	1	0
Epagnuel Breton	2	1	0
Pit Bull	2	1	0
Beagle	2	0	0
Pastor Belga	2	0	0
Perdigueiro Portugues	2	0	1
Bulldog Frances	1	2	0
Bulldog Ingles	1	1	0
Bulterrier	1	1	1
Cocker ingles	1	1	0
Cocker Spaniel	1	1	3
Serra da Estrela	1	1	1
Akita	1	0	0
Braco Alemão	1	0	0
Cane Corso	1	0	0
Cão da Serra de Aires	1	0	0
Doberman	1	0	0
Griffon	1	0	0
Jack Russel terrier	1	0	0
Pastor Australiano	1	0	1
Podengo	1	0	0
Rottweiler	1	0	1
Schnauzer	1	0	1
Shiba inu	1	0	0
Snauzer gigante	1	0	0
Spitz	1	0	0
West terrier	1	0	0
Basset Hound	0	1	1
Cão de água	0	1	0
Cocker	0	1	0
Leao de rodhesia	0	1	0
Malamute	0	1	0
Setter Gordon	0	1	0
Setter Islandes	0	1	0
Shar-pei	0	1	1
Westhighland terrier	0	1	1
Bichon Maltes	0	0	1
Bull Mastiff	0	0	1
Castro Laboreiro	0	0	1
Pequinês	0	0	1

**Anexo 3 - Valores da densidade vascular avaliada nas imagens ecográficas analisadas com a sonda linear, em dois testículos (n=2) com três medições (n=3) e diagnóstico de Leydigoma.**

Leydigoma	Sonda linear
T12	22,3%
T13	2,3%
Média	<b>12,3%</b>
Desvio padrão	14,2%

**Anexo 4 - Probabilidade de uma raça ter tumor testicular do tipo Leydigoma em comparação com outra raça (odds ratio) relativamente às raças dos cães machos atendidos no HEV-FMV (n>300) e ao nº de tumores testiculares em cada raça.**

	Boxer	Bulldog francês	Caniche	Cocker	Golden retriever	Jack russel terrier	Pastor alemão	Pitbull	Podengo	Retrievers do labrador	Rottweiler	SRD	Shih-Tzu	Teckel	Yorkshire terrier
Beagle	0.457	4.915	0.956	1.359	0.259	1.560	1.788	0.780	1.415	0.509	1.389	1.147	0.230	0.761	2.983
Boxer		10.748	2.090	2.972	0.566	3.411	3.910	1.706	3.093	1.114	3.037	2.509	0.503	1.664	6.523
Bulldog francês			0.194	0.277	0.053 **	0.317	0.364	0.159	0.288	0.104	0.283	0.233	0.047 **	0.155	0.607
Caniche				1.422	0.271 **	1.632	1.871	0.816	1.480	0.533	1.453	1.201	0.241 **	0.796	3.122
Cocker					0.191 **	1.148	1.316	0.574	1.041	0.375	1.022	0.844	0.169	0.560	2.195
Golden retriever						6.022	6.901 **	3.011	5.461	1.967	5.362	4.429 *	0.888	2.937	11.515 *
Jack russel terrier							1.146	0.500	0.907	0.327	0.890	0.736	0.147	0.488	1.912
Pastor alemão								0.436	0.791	0.285 **	0.777	0.642	0.129 *	0.425	1.669
Pitbull									1.814	0.653	1.781	1.471	0.295	0.975	3.825
Podengo										0.360	0.982	0.811	0.163	0.538	2.109
Retrievers do labrador											2.726	2.252 *	0.452	1.493	5.855 **
Rottweiler												0.826	0.166	0.548	2.148
SRD													0.201 **	0.663	2.600
Shih-Tzu														3.307	12.966 *
Teckel															3.921

**Anexo 5 - Probabilidade de uma raça ter tumor testicular do tipo Seminoma em comparação com outra raça (odds ratio) relativamente às raças dos cães machos atendidos no HEV-FMV (n>300) e ao nº de tumores testiculares em cada raça.**

	Boxer	Bulldog francês	Caniche	Cocker	Golden retriever	Jack russel terrier	Pastor alemão	Pitbull	Podengo	Retrievers do labrador	Rottweiler	SRD	Shih-Tzu	Teckel	Yorkshire terrier
Beagle	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	1	<0.001	<0.001	1	<0.001	1	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Boxer		3.056	5.968	1.126	0.382	>999.999	1.668	1.947	>999.999	1.833	>999.999	3.578 **	1.745	0.947	1.482
Bulldog francês			1.953	0.368	0.125 *	>999.999	0.546	0.637	>999.999	0.600	>999.999	1.171	0.571	0.310	0.485
Caniche				0.189	0.064 *	>999.999	0.279	0.326	>999.999	0.307	>999.999	0.600	0.292	0.159	0.248
Cocker					0.339	>999.999	1.481	1.729	>999.999	1.628	>999.999	3.178	1.550	0.841	1.316
Golden retriever						>999.999	4.365 **	5.096	>999.999	4.799 *	>999.999	9.366 *	4.567	2.478	3.879
Jack russel terrier							<0.001	<0.001	1	<0.001	1	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Pastor alemão								1.167	>999.999	1.009	>999.999	2.146	1.046	0.568	0.889
Pitbull									>999.999	0.942	>999.999	1.838	0.896	0.486	0.761
Podengo										<0.001	1	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Retrievers do labrador											>999.999	1.952	0.952	0.517	0.808
Rottweiler												<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
SRD													0.488	0.265	0.414
Shih-Tzu														0.543	0.849
Teckel															1.565

\* As raças Beagle, Jack Russel terrier, Podengo e Rottweiler não apresentaram tumores testiculares do tipo seminoma.